

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL
TRANSPORTE DE IONES Y LA
ENCAPSULACIÓN SELECTIVA DE
LIGANDOS BASADAS EN
 α,γ -CICLOPÉPTIDOS**

Alberto Fuertes García

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL TRANSPORTE DE IONES Y LA
ENCAPSULACIÓN SELECTIVA DE LIGANDOS BASADAS EN α,γ -
CICLOPÉPTIDOS

D. Alberto Fuertes García

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hará referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, ... de de 2019

Fdo.



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/ TUTOR DE LA TESIS

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL TRANSPORTE DE IONES Y LA ENCAPSULACIÓN SELECTIVA DE LIGANDOS BASADAS EN α,γ - CICLOPÉPTIDOS

D. Juan Ramón Granja Guillán
D. Manuel Amorín López

INFORMAN:

Que la presente tesis se corresponde con el trabajo realizado por D. Alberto Fuertes García, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, ... de de 2019

Fdo. Juan R. Granja

Fdo. Manuel Amorín



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, Juan R. Granja y Manuel Amorín, puesto que sin ellos nada de lo que viene a continuación habría ni tan siquiera existido. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos y por poner a mi disposición todos los medios necesarios para que pudiera llegar a ser el investigador en el que me he convertido en la actualidad. Por fomentar mi pensamiento crítico, evitar que diese nada por sentado e inculcarme el rigor científico necesario para llevar a cabo un trabajo como este.

A las diferentes instituciones que me han financiado a nivel personal durante los años que he estado trabajando en esta tesis: la Fundación Segundo Gil Dávila, la Xunta de Galicia y el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España por haberme concedido becas para desempeñar mi trabajo en estos casi 5 años. Además de estas, también me gustaría dar las gracias a estas y otras instituciones por haber financiado la labor investigadora del grupo con diversos proyectos de investigación en los que he participado.

Al Prof. Neal K. Devaraj por haberme brindado la posibilidad de realizar una estancia en su grupo de investigación en la Universidad de California, San Diego y a Roberto J. Brea por haberme ayudado enormemente, tanto a nivel científico como personal, durante el tiempo que estuve en San Diego. Gracias por haberme permitido vivir una de las experiencias más alucinantes de mi vida, incluida la anécdota de “cuando me paró la policía”.

A todos mis compañeros de laboratorio, desde los más veteranos que acogieron a aquel chaval nervioso de TFG que no había pisado un laboratorio de investigación en su vida, hasta los más jóvenes (y no tan jóvenes) con los que he coincidido en esta última etapa. Gracias por haberme enseñado tantas cosas y haberme hecho pasar tan buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Creo que hemos sido una gran familia que ejemplifica el trabajo en equipo y el apoyo mutuo en las situaciones complicadas, sin duda un ejemplo en el que cualquier otro grupo de investigación querría verse reflejado. A todos vosotros os deseo lo mejor en el futuro, os lo merecéis.

Al resto de miembros del grupo de investigación como Javier Montenegro, Rebeca García-Fandiño, Martín Calvelo y Luis Castedo. Por las interesantes discusiones científicas y sugerencias que han aportado durante el transcurso de este trabajo. Además, me gustaría agradecer en especial a Martín su total disponibilidad a la hora de realizar estudios computacionales que han contribuido al desarrollo de esta tesis, a pesar de que en este manuscrito solo se recogen una pequeña parte de ellos.

A la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela por poner a mi disposición sus medios técnicos para el correcto desarrollo de mis proyectos. En especial me gustaría destacar al técnico de RMN del CIQUS, Ramón Gesto, que ha sido el encargado de llevar a cabo la mayoría de los experimentos a campos magnéticos elevados. Además, me gustaría agradecer a todo el personal técnico del CIQUS, en especial a Arcadio Guerra (aunque a él también se le aplica todo lo dicho dos párrafos más arriba), porque además de ser un técnico de 10, se puede decir que fue como un *padre* durante mis primeros pasos en el laboratorio.

A Eugenio Vázquez por haber diseñado la mayoría de las figuras tridimensionales esquemáticas de los CPs y otras estructuras que están incluidas en esta memoria.

A colaboradores de otras instituciones, como por ejemplo Ignacio Alfonso (IQAC) por sus tutoriales sobre DOSY, a Pedro Nieto (CSIC) por habernos ayudado con experimentos de RMN heteronucleares o a Manuel Marcos (CACTI-UVigo) por haber realizado análisis de espectrometría de masas de nuestras complejas muestras.

A todas las demás personas que hayan contribuido en mayor o menor medida al desarrollo de esta etapa de mi vida y no estén citados en los puntos anteriores.

Entrando en el terreno más personal, me gustaría acordarme de todo mi grupo de amigos, que han servido como válvula de escape siempre que los he necesitado y siempre han estado dispuestos a escucharme cuando lo necesitaba.

A Marisa, por además de ser compañera de laboratorio, ser compañera de infinitas vivencias fuera de él. Sin lugar a duda has sido uno de los mayores apoyos durante estos años de tesis (y todos los anteriores). La *química* hizo que se cruzasen nuestros caminos y, tras todo lo que hemos *experimentado* juntos, debo reconocer que le estaré eternamente agradecido por haberme dado la oportunidad de conocerte.

Por último, me gustaría dedicarle unas líneas a mi familia, por apoyarme en todo momento y, muy especialmente a mis padres. Por hacer posible que haya recibido en todo momento la mejor formación posible, un largo proceso que se materializa en este trabajo. Creo que una buena educación (en su más amplio sentido) es el mejor regalo que le pueden hacer a uno, y en ese aspecto he sido un auténtico privilegiado (aunque a veces me haya costado darme cuenta). Por enseñarme que el esfuerzo tiene recompensa y mostrarme el valor del trabajo bien hecho. En definitiva, por convertirme en la persona que soy hoy en día. Gracias, gracias y gracias.

Índice

Abreviaturas.....	11
Resumen	17
Summary.....	21
Introducción.....	27
1. Química supramolecular	27
1.1. Autoensamblaje y reconocimiento molecular	29
1.2. Sistemas <i>host-guest</i>	32
1.2.1. Receptores moleculares covalentes	32
1.2.2. Cápsulas autoensambladas	42
1.3. Nanotubos basados en el autoensamblaje de subcomponentes	57
1.3.1. Nanotubos y dímeros constituidos por α -CPs	62
1.3.2. Nanotubos y dímeros constituidos por α,γ -CPs.....	65
1.3.3. Sistemas constituidos por otros CPs.....	71
1.3.4. Aplicaciones de los sistemas supramoleculares basados en CPs	74
2. Transporte transmembranal de iones.....	80
2.1. Sistemas naturales	80
2.2. <i>Membrane spanners</i>	83
2.3. Ionóforos/ <i>carriers</i>	89
Objetivos.....	101
Capítulo I: Nanotubos autoensamblados tipo Venturi.....	109
1. Diseño.....	111
2. Metodología sintética	114
3. Estudios de dimerización y formación de nanotubos.....	124
Capítulo II: Nuevos transportadores de membrana basados en α,γ -ciclo péptidos	139
1. Transportadores de tipo <i>membrane spanner</i>	143
2. Transportadores tipo ionóforo/ <i>carrier</i>	155
Capítulo III: Encapsulación de ligandos ditópicos mediante dímeros α,γ -ciclo péptidos	175
1. Encapsulación de ligandos homoditópicos con ciclohexapéptidos.....	175
1.1. Encapsulación de dinitrilos tras la complejación de iones metálicos.....	176
1.2. Alquil-diamonios.....	188
2. Encapsulación de ligandos heteroditópicos mediante ciclooctapéptidos.....	208
2.1. Antecedentes	208
2.2. Diseño de la cápsula heteroditópica	210
2.3. Síntesis	213

2.4.Caracterización de las cápsulas heterodiméricas y de los complejos <i>host-guest</i>	218
Conclusions.....	241
Experimental section.....	247
General remarks.....	247
Chapter I	249
Chapter II.....	262
Chapter III.....	285
Anexo: Espectros de RMN y FT-IR	311
Capítulo I.....	311
Capítulo II.....	327
Capítulo III	339



Abreviaturas

$[\alpha]_D^{20}$	rotación óptica específica a 20 °C con lámpara de sodio
δ	desplazamiento químico (ppm)
λ_{\max}	longitud de onda del máximo de Abs
ν	número de onda
ρ	densidad
γ -Aca	ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
γ -Ace	ácido <i>cis</i> -4-aminociclopent-2-enocarboxílico
γ -Ach	ácido <i>cis</i> -3-aminociclohexanocarboxílico
γ -Acp	ácido <i>cis</i> -3-aminociclopentanocarboxílico
γ -Aga	ácido 1-glucurónico
γ -Ahf	ácido 4-amino-3-hidroxitetrafurano-2-carboxílico
Aa	aminoácido
AB	acoplamiento con efecto tejado
Abs	absorbancia
AcHyd	acetilhidrazida
Ala	alanina
9-ant	ácido 9-antraceno-carboxílico
aq	disolución acuosa
AQCF	carboxifluoresceína autoapagada
Ar	argón
Arg	arginina
t-BAr_F	<i>tetrakis</i> (3,5- <i>bis</i> (trifluorometil)fenil)borato
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
(Boc) ₂ O	anhídrido de <i>tert</i> -butiloxicarbonilo

Boc-O ₂ Oc-OH	ácido 8-(<i>tert</i> -butilcarbonilamino)-3,6-dioxaoctanoico
br	pico ancho
C ₃ N ₃	propilazida
CB[n]	cucurbiturilo formado por n unidades de glicolurilo
Cbz	benciloxicarbonilo
CD	ciclodextrina
CF	5(6)-carboxifluoresceína
COSY	espectroscopía de correlación
CP	ciclopéptido
CuAAC	cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I)
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de ¹³ C
d	doblete
D	dímero
D _A	dímero alternado
DC	dicroísmo circular
dd	doble doblete
ddd	doble doble doblete
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
D _E	dímero eclipsado
DEPT	incremento no distorsionado por transferencia de polarización de ¹³ C
DIEA	diisopropiletilamina
dip	dipéptido
DLS	Dispersión dinámica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
D _{obs}	difusión observada

DOSY	espectroscopía de orden difusional
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
dt	doble triplete
<i>D</i>	coeficiente de difusión
EDC·HCl	hidrocloruro de la <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
ESI	ionización por electrospray
EYPC	fosfatidilcolina de yema de huevo
FTIR	espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
5-FU	5-fluoroacilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etansulfónico
hexa	hexapéptido
HPTS	ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (piranina)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear de ¹ H
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	espectroscopía de correlación cuántica simple heteronuclear
<i>J</i>	constante de acoplamiento
<i>K_a</i>	constante de asociación
LG	nitrato de bis- <i>N</i> -metilacridinio (lucigenina)
LUVs	vesículas unilamelares grandes
m	multiplete
<i>M_w</i>	peso molecular
MALDI	espectroscopía de masas por ionización láser asistida por matriz
MOF	entramado metaloorgánico
MS	espectrometría de masas
m/z	relación masa/carga
<i>N</i>	número de Avogadro

N-HATU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino
N-HBTU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino
N-TBTU	tetrafluoroborato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino
NDI	naftalendiimida
nOe	efecto nuclear Overhauser
NOESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
Ns	2-nitrobencenosulfonilo/nosilo
NT	nanotubo
NTV	nanotubo tipo Venturi
O ₂ Oc	ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
octa	octapéptido
PEG	poli-etilenglicol
PN ₃	<i>tris</i> -(2-aminofenil)fosfina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
ppm	partes por millón
Pra	propargilglicina
prop	propargil(o)
q	quintuplete
r _h	radio hidrodinámico aparente
RMN	resonancia magnética nuclear
ROESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el plano rotatorio
s	singlete
SANS	dispersión de neutrones de ángulo pequeño
SCPN	nanotubos peptídicos autoensamblados
t	triplete
t _{1/2}	tiempo de vida media

t.a.	temperatura ambiente
TBTA	<i>tris</i> [(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
td	triple doblete
TFA	ácido trifluoroacético
TMEDA	tetrametiletilendiamina
TPA	<i>tris</i> (2-piridilmetil)amina
TMSS	<i>tetrakis</i> (trimetilsilil)silano
TOCSY	espectroscopía de correlación total
TOF	analizador de tiempo de vuelo
TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina
TpTP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (<i>p</i> -tolil)porfirina
tetra	tetrapéptido
tren	<i>tris</i> (2-aminoetil)amina
Tris	2-amino-hidroxilmetil-propano-1,3-diol
TTF	tetratíafulvaleno



Resumen

Desde el desarrollo de la química moderna, existe la necesidad creciente de obtener estructuras cada vez más complejas desde el punto de vista de su tamaño, función o biocompatibilidad. Por ello, en un primer momento, la química sintética ha jugado un papel relevante a la hora de desarrollar nuevas metodologías para la obtención de enlaces químicos covalentes o nuevas estrategias para la modificación selectiva de grupos funcionales. A pesar del gran avance que ha experimentado la síntesis orgánica en las últimas décadas, siguen existiendo limitaciones a la hora de obtener ciertas estructuras complejas de gran tamaño y que presenten grupos funcionales orientados en una zona precisa del espacio tridimensional, ya que su preparación, mediante únicamente estrategias basadas en la formación de enlaces covalentes, es hoy en día inabordable desde el punto de vista del tiempo y el esfuerzo humano que requieren. Es por ello por lo que ha emergido una nueva área, conocida como química supramolecular, la cual estudia y utiliza las interacciones débiles que van más allá de las moléculas singulares. Esta disciplina, la química supramolecular, se centra en el estudio de las interacciones entre diferentes entidades químicas mediante las conocidas como fuerzas no covalentes, que incluyen el enlace de hidrógeno, las interacciones tipo π o las fuerzas de Van der Waals, etc. Esta estrategia permite que precursores sintéticamente sencillos se asocien para dar lugar a morfologías tridimensionales complejas. Este fenómeno se logra combinando varias de estas interacciones las cuales, a pesar de tener individualmente una contribución entálpicamente pequeña, a nivel global son capaces de superar la barrera entrópica que supone ordenar tantas subunidades en una estructura supramolecular compleja.

Dentro de la gran diversidad de topologías a las cuales ha sido posible tener acceso siguiendo esta estrategia supramolecular, caben destacar las estructuras tubulares y otras arquitecturas con cavidades que presenten grupos funcionales a la carta, las cuales se suelen englobar en una categoría conocida como “cápsulas supramoleculares”. La relevancia de estos últimos complejos reside en su capacidad para confinar pequeñas moléculas en su interior de forma selectiva. Estos procesos de reconocimiento molecular tienen implicaciones muy significativas en campos como la catálisis, el desarrollo de sensores o en la emulación de procesos biológicos básicos. De esta forma, el desarrollo de reacciones específicas en espacios confinados o el desplazamiento de sustancias a través de membranas lipídicas pueden ser imitados empleando macrociclos sintéticos más sencillos, los cuales nos permiten incrementar el conocimiento que tenemos sobre el funcionamiento de la complicada maquinaria biológica a nivel molecular.

En el campo de la química supramolecular, nuestro grupo de investigación ha desarrollado en las últimas dos décadas una robusta metodología para la síntesis de péptidos cíclicos (CPs) compuestos por varios tipos de aminoácidos (Aas) diferentes. En particular, es pionero en el uso de γ -aminoácidos cíclicos (γ -Aca) en combinación con α -aminoácidos naturales de quiralidad opuesta. Esta especial combinación da lugar a péptidos que tienden a adquirir una conformación plana que facilitan la interacción con otros péptidos similares. Todo ello permite la posterior formación de largas estructuras tubulares huecas por el apilamiento de los CPs. Alternativamente, se pueden preparar unidades más cortas mediante el bloqueo del ensamblaje al sustituir los protones amídicos de una de las caras del CP por grupos alquílicos que impiden la formación de los enlaces de hidrógeno entre CPs. La principal característica que presentan estos α,γ -CPs es la asimetría que presentan sus dos caras, dado que en cada una de ellas se proyectan únicamente los grupos NH y carbonílicos de una única familia de Aas (α o

γ). Esta característica, junto con la capacidad de modificar el diámetro interno del anillo variando el número total de Aas que lo componen, permite modular la fortaleza de las interacciones que dirigen el ensamblaje supramolecular. Por tanto, la estructura resultante puede poseer una cierta respuesta química frente a determinados estímulos externos. Además, los γ -Acas proyectan hacia el interior de la cavidad un grupo metileno (posición β del cicloalcano), que abre la puerta a la obtención de cavidades funcionalizadas al utilizar un γ -Aca que contenga esta posición modificada.

Con la idea de profundizar en el estudio de estas estructuras supramoleculares y aprovechar la capacidad para preparar cavidades funcionales con topologías definidas, el contenido de esta tesis doctoral se centrará en el diseño y la síntesis de nuevos α,γ -CPs modificados en su eje vertical, que incorporen sobre el átomo de nitrógeno del γ -Aca grupos funcionales. Esta incorporación abre la puerta a la obtención de cápsulas supramoleculares, así como nuevas topologías tubulares en la escala nanométrica.

En el primer capítulo de esta memoria, se aborda la síntesis de una nueva clase de estructuras nanotubulares que, de forma pionera, presentan un diámetro alternante. Para dicho fin, se utilizaron dos tipos de CPs bloqueados en su cara γ que presentan diferentes tamaños (diferente número de Aas en su secuencia), los cuales presentan variaciones significativas en su constante de dimerización. Para poder llevar a cabo la unión covalente de los dos tipos de anillos, se optó por una cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre una azida y un alquino, comúnmente conocida como reacción de *click*, dada la ortogonalidad que ambos grupos reactivos presentan con respecto a las estrategias de la síntesis peptídica. Para ello se propuso la utilización de un α,γ -ciclooctapéptido equipado con dos grupos propargilo y un α,γ -ciclotetrapéptido con cadenas de propilazida. El *bis*-ciclopéptido covalente resultante de esta transformación química presenta, como era de esperar, dos posibles modos de interacción con otros péptidos (formación de láminas β) con propiedades muy diferentes entre sí. Por un lado, la cara α del octapéptido presenta una constante de asociación elevada en disolventes apolares como el cloroformo ($K_a > 10^6$). Alternativamente, el tetrapéptido posee una constante de asociación, según los cálculos empíricos basados en modelos termodinámicos, varios órdenes de magnitud más baja. Esta gran diferencia de K_a le confiere al sistema unas características que permiten modular el grado de agregación de los nanotubos resultantes. Así, fue posible determinar por RMN la influencia que tenían ciertos parámetros, como la concentración de la muestra o la temperatura del medio en el equilibrio entre monómeros discretos y nanotubos. También fue posible bloquear el crecimiento de los nanotubos mediante la adición de pequeñas cantidades de disolventes próticos que compiten por las interacciones entre los tetrapéptidos. Alternativamente, la incorporación al sistema de un ciclopéptido complementario al octapéptido promueve la formación preferente de heterodímeros, imposibilitando la sucesiva agregación del sistema y restringiendo el proceso de autoensamblaje a la formación de pequeños tubos formados por tres (medios próticos) o seis anillos peptídicos. Para estimar los tamaños de las especies en disolución y sacar así información relativa al grado de agregación del sistema se recurrió a la técnica de DOSY, la cual arrojó correlaciones claras entre concentración y el tamaño de las estructuras supramoleculares obtenidas.

En el segundo capítulo, decidimos mantener una estrategia similar a la hora de preparar los péptidos cíclicos funcionalizados para tener acceso a unas estructuras que pudiesen comportarse como transportadores de membrana imitando a las moléculas anfipáticas que existen en la naturaleza conocidas como ionóforos. Los ionóforos son capaces de transportar con una gran eficiencia cationes y aniones inorgánicos difundiendo entre ambos lados de la

bicapa lipídica. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de estructura-actividad con una familia de CPs que diferían en el tamaño del anillo (hexámeros y octámeros) y con un número variable de apéndices ionóforos que se incorporaban en el plano vertical. Este número se gobernaba por la cuantía de Aas *N*-propargilados que se incorporaban en su estructura. Esta estrategia permitió acoplar diferentes cadenas de oligoetilenglicol de longitudes variables mediante una reacción tipo *click*. Dicha conjugación debe dar lugar a unas moléculas que poseen una parte central rígida y con un orificio de la que se irradian un número variable de tentáculos a ambos lados del dímero macrocíclico. La finalidad de estas moléculas era la de provocar un incremento de permeabilidad en las membranas que facilitase el transporte de protones. A pesar de que estos péptidos mostraban la capacidad de transportar diversos iones, los resultados fueron bastante modestos, por lo que decidimos variar el modelo de transporte.

Para dicho fin, nuestra estrategia se basó en la incorporación de anillos de piridinas al final de la cadena propargílica. Las propiedades coordinantes de las piridinas son claramente superiores a las de las cadenas utilizadas en el primer diseño a la hora de llevar a cabo la migración de iones inorgánicos. De esta forma, tras la síntesis peptídica fue posible incorporar grupos directores tipo piridina, usando la reacción de Sonogashira con diferentes isómeros de yodo-piridina. Los ionóforos resultantes presentaron una actividad magnífica a la hora de transportar iones inorgánicos a través de membranas lipídicas modelo. Los experimentos realizados sirvieron para demostrar que estas moléculas, en su forma dimérica, actuaban como *symporters*, ya que eran capaces de facilitar el tránsito transmembranal simultáneo de un catión y un anión. Curiosamente, cuando se estudiaron las propiedades transportadoras de un heterodímero formado por un CP dotado de tres piridinas con otro no funcionalizado, se observaba una pérdida prácticamente total de su actividad. Este resultado pone de manifiesto que ambas tapas de *tris*-piridina son necesarias para desempeñar un transporte efectivo. Por último, los experimentos mecanísticos llevados a cabo excluyen que el transporte de iones tenga lugar mediante la formación de canales de membrana con largos tiempos de apertura o mediante un mecanismo tipo “*ion hopping*”, sugiriendo, por el contrario, un modo de acción tipo *carrier*.

En el tercer capítulo de esta memoria, nos centramos en el estudio de la capacidad que presentan los dímeros estudiados en el capítulo previo para actuar como cápsulas supramoleculares versátiles. También se amplió el estudio con otras cápsulas de cavidad más grande (α,γ -ciclooctapeptídicas) pero dotadas de metaloporfirinas en vez de los anillos de piridina. Estas tapas moleculares deberían actuar, en este caso, como grupos directores en la encapsulación de ligandos amino-carboxílicos.

Los estudios realizados con α,γ -ciclohexapéptidos equipados con diferentes isómeros de piridinas se dirigieron a evaluar la capacidad de las tapas piridínicas para dirigir la inclusión de ligandos tipo diamonios lineales. Al analizar los ligandos alquílicos de diferentes longitudes, se pudo observar por RMN la variación de las señales en el dímero de los hexapéptidos, lo que evidencia la interacción con las especies dicatiónicas. Además, se observó por DOSY que existe una relación directa entre la longitud del ligando bajo estudio y el tamaño de las especies supramoleculares que se forman. Este comportamiento se atribuye a que, si la longitud de la molécula huésped no es la apropiada para formar el aducto de inclusión, el sistema tiende a formar entramados moleculares de mayor tamaño derivados de interacciones intermoleculares en donde los diamonios interaccionan con diferentes dímeros ciclopeptídicos por su parte externa.

La presencia de las tres unidades de piridina también permite explorar la encapsulación de otros ligandos a través de la coordinación inicial de un metal de geometría apropiada que dirija la incorporación de un cuarto ligando (molécula huésped) en la cavidad definida por el dímero. A este respecto, hemos explorado el uso de sales de Cu(I), que forman complejos de geometría tetraédrica, los cuales satisfacen las necesidades de nuestro sistema. Para desarrollar este concepto, nos basamos en una primera etapa en la que tenga lugar la complejación de una unidad de CuI en cada una de las tapas *tris*-piridínicas. Los complejos derivados de esta interacción demostraron ser estables durante varios días y se pudieron caracterizar mediante diversas técnicas. La siguiente etapa consistió en generar un lugar de coordinación en el centro metálico mediante la substracción del ion yoduro, para lo cual este complejo se trató con una sal de plata para su precipitación. Desafortunadamente, tras llevar a cabo esta precipitación en presencia de una variedad de ligandos tipo dinitrilo de diferente longitud, siempre se observaba la degradación de la muestra. Posiblemente, la causa de esta resida en la oxidación de Cu(I) a Cu(II) tras perder el ion yoduro que le acompaña, lo que imposibilita la detección de los complejos de encapsulación de dinitrilos en la cápsula.

En cuanto a las cápsulas derivadas de ciclooctapéptidos, se siguió una estrategia sintética que permite posicionar en el plano vertical al macrociclo peptídico dos grupos hidrazida. De esta manera, se puede diseñar una porfirina complementaria dotada de dos unidades de benzaldehído en posiciones meso no adyacentes para llevar a cabo la condensación al CP. De esta forma se obtuvo una cápsula que se mantiene unida por el proceso de dimerización del CP y, además, por los enlaces hidrazona entre este y las tapas de porfirina. En este punto, fue posible equipar a este precursor con diferentes centros metálicos, tal como Zn(II) o Sn(IV). Con esta combinación de metales se decidió llevar a cabo el reconocimiento de moléculas con ligandos que tuviesen dos grupos funcionales diferentes, cada uno de ellos complementario con uno de los centros metálicos. En nuestro caso particular, estos grupos resultaron ser un anillo de piridina, que forma complejos estables con las metaloporfirinas de Zn, y un anillo de ácido benzoico complementario con la porfirina de Sn. De esta manera, esperábamos poder observar un proceso de auto-selección (*self-sorting*) inducido por la adición de un ligando apropiado, que desplazaría el equilibrio hacia la formación del complejo de inclusión heterodimérico exclusivamente, frente a todas las posibilidades que estadísticamente se podrían dar en presencia de los dos precursores de las cápsulas (dos homodímeros y un heterodímero). En esta línea, se sintetizaron una serie de ligandos heterofuncionales lineales y relativamente rígidos para estudiar su encapsulación por parte de la mezcla equimolar de ambos CPs. En primer lugar, se realizaron valoraciones mediante espectroscopía UV-vis, que revelaron un comportamiento complejo y en ocasiones algo errático sobre el proceso de interacción cápsula-ligando. Se pudo observar que analizando parámetros como la Abs o la λ_{max} de la banda Soret o, mejor dicho, de la mezcla de bandas Soret, de las porfirinas de Zn y Sn en presencia de diferentes cantidades de ligandos, no se podía obtener información concluyente sobre las diferencias de afinidad entre ligandos. Finalmente, comprobamos mediante RMN que al incubar uno de los ligandos con un tamaño similar al de la cápsula, aparecían nuevas señales que se correspondían con los protones del ligando, pero en regiones diferentes a las habituales para este tipo de anillos aromáticos. Este comportamiento se debe a la disposición del ligando en el cono de anisotropía de las tapas de porfirina que causan el apantallamiento de las señales del ligando. Este comportamiento, confirma claramente la encapsulación del ligando y la confirmación de que se han preparado capsulas capaces de reconocer ligandos hetero-difuncionales de forma selectiva.

Summary

Since the development of modern chemistry, there has been a constant need to obtain more and more complex molecular structures in terms of their size, function and biocompatibility. That is the reason why, since the early days of this field, synthetic organic chemistry has played a relevant role in the development of new methodologies for the discovery of new covalent bond-forming reactions as well as the selective transformation of specific functional groups. Despite all the groundbreaking advances experienced in organic synthesis during the last decades, there are still limitations when trying to obtain large and complex molecules that present a specific tridimensional topological disposition of functional groups, whose synthesis still demands plenty of manpower and time. To overcome this limitation, a new discipline has emerged, known as supramolecular chemistry, which is devoted to the study of weak interactions, such as hydrogen bonding, π -stacking or dispersion forces, between different molecules. This strategy allows synthetically simple precursors to be arranged providing complex tridimensional architectures. This goal is achieved upon the combination of several of these weak interactions which, despite delivering a small enthalpic contribution individually, add up to overcome the entropic barrier associated with bringing together a variety of individual molecules to generate a supramolecular complex.

Among the vast diversity of different topologies that have been developed since the emergence of supramolecular chemistry, tubular structures as well as molecules that present functional groups directed towards a cavity, generally known as molecular capsules, have been of great interest. Molecular capsules are of particular importance due to their ability to confine small molecules in their lumen selectively. These processes can have important implications in fields such as catalysis, the development of molecular sensors or when trying to emulate specific biological transformations. In this regard, highly selective chemical transformations in confined spaces as well as the translocation of ions across biological membranes, can be reproduced using simple synthetic molecules to gain some insights about how complex biological machinery operates in living systems.

During the last two decades, our research group has developed a robust methodology for the synthesis of cyclic peptides (CPs) made of a variety of amino acids (Aas). Notably, it has pioneered the incorporation of cyclic γ -Aas intercalated between natural α -Aas of opposing chirality. This particular mix provides peptides which are prone to achieve a planar conformation that facilitates the interaction between different peptide subunits. This allows the further association of different subunits to generate long hollow tubes composed of piled-up CPs. Alternatively, shorter tubes (dimers) can be assembled by the substitution of the amide protons of the peptidic backbone on one of the peptide's faces by alkyl groups. The main characteristic that this α,γ -CPs present is, precisely, the asymmetry of their two faces, given that each of them presents the NH and carbonyl group of a single Aa family (either α or γ). This property, in addition to the simple modification on the internal diameter of the ring (achieved by the modification on the number of Aas that are included in its sequences), provides a fine tunability on the strength of the interactions that govern the self-assembly. Hence, the resulting supramolecular structure can present a certain capacity to respond to certain external stimuli. Moreover, γ -Aas present a methylene group (β position on the cycloalkane moiety) projected towards the lumen, which provides a unique opportunity to achieve modified cavities by incorporating γ -Aas with chemical modifications on this particular position.

Considering all these properties, this Ph.D. dissertation will cover the study of these supramolecular platforms, with a special focus on the design and synthesis of new dimeric α,γ -CPs which are functionalized on the vertical plane of the ring. We envision that these molecules can act as precursors of new supramolecular capsules as well as building blocks in novel nanotube architectures.

The first chapter of these manuscript covers the synthesis of a family of tubular assemblies with nanoscale lengths which, for the first time, present an alternating diameter. Towards this end, we have covalently-attached two CPs whose supramolecular stacking is blocked on the γ -face and that display different sizes (different number of Aas in their sequences), which gives rise to significant differences in their association constants to give dimers. The covalent linkage of the two rings was achieved by means of a CuAAC reaction, commonly referred to as click reaction, given the total orthogonality that both reactive groups present along with the peptide synthesis strategy. We propose the incorporation of a propargyl group onto the skeleton of a α,γ -cyclic octapeptide and a propyl-azide chain onto a γ -cyclic tetrapeptide, whose combination gives rise to a covalent *bis*-cyclic peptide adduct with remarkably different modes of interaction (β -sheet type interactions) with other peptides. On the one hand, the α -face of the larger peptide is known to provide large association constants ($K_a > 10^6$) in nonpolar solvents (i.e., chloroform), whereas the cyclic tetrapeptide presents a several orders of magnitude lower association constant, according to our experimental measurements based on thermodynamic models. These remarkable differences in their association constant allow the system to be externally modulated in terms of its aggregation behavior. In this regard, it was possible to determine by NMR measurements how parameters such as the concentration of the sample or the temperature of the external media affect the equilibria of the system between singular monomers and nanotubes. Also, it was possible to prevent the assembly into nanotubes upon the addition of small amounts of protic solvents, which compete for the interaction between the cyclic tetrapeptides. It is also possible to inhibit the linear growth of the complexes by adding a CP complementary to the cyclic octapeptide, with which the former preferentially forms heterodimers, thus preventing the stacking of further *bis*-cyclic peptide subunits in a way that produces only small tubes made of three (protic media) or six (non-polar solvents) peptide rings. To assess the molecular sizes of the species mentioned above in solution and obtain some insights about the degree of aggregation in the system we have used DOSY measurements, which exhibited clear correlations between complex size and sample concentration.

In the second chapter, we developed a similar strategy in which we used functionalized cyclic peptides to gain access to a family of structures that could act as membrane transporter agents, emulating the natural amphipathic molecules known as ionophores. These ionophores can translocate inorganic cations and anions across lipid bilayers with excellent efficiency. To this end, we first performed a structure-activity study on a group of α,γ -CPs that presented differences in their ring size (hexamers and octamers) and in the number of ionophoric pendants that were incorporated on the vertical axis of the macrocycle. This number was governed by the amount of *N*-propargylated γ -Aas that were incorporated in the sequence, which allowed the attachment of a variety of oligoethyleneglycol chains by means of a click chemistry procedure. This particular design gives rise to molecules that are made of a hollow central rigid core to which different tentacles that span the membrane are connected. The primary function of these molecules was to facilitate proton transport across lipid bilayers. Even though they showed the desired behavior, their results were pretty modest in terms of activity, which forced us to switch to a different transport model.

Towards this end, we decided to incorporate pyridine rings at the end of the alkyne chains, knowing that coordinating properties of pyridine moieties could present some benefits for ion transport as compared to the long linear chains used in the first approach. After peptide synthesis, it was possible to incorporate the desired pyridine moieties utilizing a Sonogashira reaction in the presence of several iodo-pyridine isomers. The resulting ionophores presented a remarkable activity for the transport of inorganic ions across model lipid bilayers. Several transport experiments demonstrated that these molecules act as symporter agents, in which both a cation and an anion are translocated simultaneously. Interestingly, when the corresponding heterodimeric model with a non-functionalized CP was tested, we observed a total loss of ion transport in the system, which shows that both tripiridine caps are required to carry out an efficient transport process. Finally, mechanistic studies revealed that the mode of action was consistent with a carrier-like model, excluding both the generation of a permanent ion channel or an ion-hopping mechanism.

In the third chapter of this dissertation, we have utilized the possibilities that the pyridine-peptide dimers described in the second chapter present as versatile molecular capsules. We have also extended this approach to other capsules with a larger cavity (i.e., α,γ -cyclic octapeptides) that are equipped with metalloporphyrin caps instead of pyridine rings. These closed caps can act as directing groups towards the formation of inclusion complexes with amino-carboxyl ligands.

Studies on pyridine-peptide hybrids focused on exploiting the ability of the coordinating moiety to direct the incorporation of cationic diammonium guests into the cavity of the dimer. To that end, we analyzed alkyl-diammonium molecules of different lengths by NMR, that revealed significant changes in the signals of the cyclic hexapeptide skeleton, which evidences an interaction with the cationic species. Also, DOSY NMR experiments showed a clear relationship between the length of the ligand under study and the final size of the supramolecular complexes that are formed upon these interactions. This behavior can be correlated with an unmatched size between the cavity and the guests, which gives rise to the formation of large supramolecular aggregates derived from host-guest interactions on the external dimeric region if the guest is unfit for the cavity.

Pyridine rings acting as capsule lids also allows the encapsulation of other ligands after the initial coordination of a metal center with an appropriate geometry. In this regard, the metal ion can direct the incorporation of a fourth ligand (guest molecule) into the void described by the peptide dimer. For this purpose, we have studied different tetrahedral Cu(I) salts that would match the requisites of the desired system. We have focused our efforts on a strategy in which, firstly, CuI is complexed to both tri-pyridine moieties. The resulting di-copper complexes were stable for several days and could be characterized by different techniques. The following step was devoted to subtracting the iodide ion attached to the copper to unveil the desired fourth coordination site on the metal, for which we treated the complex with a silver salt to favor the precipitation of AgI. Unfortunately, after carrying out this process in the presence of a variety of dinitrile ligands of different lengths, we were unable to detect the formation of the complex due to the fast degradation of the sample. This observation is probably caused by a Cu(I) to Cu(II) oxidation, which takes place immediately after the iodide ligand is removed from the medium.

Regarding the molecular capsules based on cyclic octapeptides, we followed a synthetic strategy based on the incorporation of two hydrazide groups connected to different ends of the

peptide skeleton. With this approach, a complementary porphyrin that incorporates two aldehyde groups can be synthesized to carry out the condensation (hydrazone formation) with the cyclic peptide. Hence, a capsule can be assembled through the hydrazone bonds and the dimerization process between the CP subunits. At this point, it was possible to equip this intermediate with a metal center such as Zn(II) or Sn(IV), which gives rise to two different half-capsule units. With this bimetallic approach, we envision the molecular recognition of ligands that present two different functional groups, each of them complementary with one of the metal centers. These functional groups were selected to be pyridines, which are recognized by Zn metalloporphyrins, and benzoic acid rings, complementary to the Sn center. We aimed to induce a self-sorting process upon the addition of an appropriate ligand, in which, from all possible statistical dimers (homo- and hetero-) that could be generated, only the heterodimeric bimetallic capsule should be observed in the presence of a heterodifunctional guest.

Thus, we synthesized different linear and rigid difunctional guests to study their encapsulation with an equimolar mixture of both peptide-metalloporphyrin hybrids. First, we analyzed the interaction by UV-vis titrations which revealed a complex and somehow erratic behavior during the complexation step. Analysis of parameters such as Abs and λ_{max} of the Soret band of the two porphyrins was insufficient to obtain evidence about the affinities of the ligand for the capsule. Finally, we employed NMR analysis to show that after the incubation of a ligand that fits the capsule with an equimolar mixture of both half-capsules a new set of signals emerge for the guest in a region of the spectrum unusual for this type of molecules. This anomaly can be explained by the disposition of the guest protons directly under the anisotropy cone of the porphyrin caps, which causes the observed shielding. This evidence confirms the incorporation of the guest to the cavity and confirms the ability of these novel heteromeric capsules to recognize heterodifunctional ligands.

Introducción





Introducción

1. Química supramolecular

Desde el nacimiento de la alquimia en la antigüedad, uno de los principales retos que ha afrontado el campo de la química es comprender y, posteriormente, emular las transformaciones que llevan a cabo los organismos vivos. Si se tiene en cuenta la escala de tiempo durante la cual la evolución lleva perfeccionando la maquinaria biológica, no es descabellado pensar que a la “joven” ciencia química aún le queda mucho camino por recorrer para intentar aproximarse al nivel de sofisticación y complejidad que se observa en la mayoría de los sistemas biológicos. Desde mediados del siglo XVIII, cuando podemos considerar que nace la “química moderna” con los trabajos de Lavoisier, la mayoría de los esfuerzos se centraban en encontrar nuevas metodologías de síntesis de moléculas basadas en la generación de enlaces covalentes. Con esta estrategia, los químicos fueron capaces de organizar y unir átomos de manera relativamente eficiente, logrando progresivamente moléculas de mayor complejidad a partir de sustancias de partida relativamente simples, mediante el desarrollo de procesos sintéticos con los medios disponibles a su alcance.¹ No obstante, la obtención de moléculas que presentan un gran tamaño, complejidad funcional o con un número elevado de átomos en su estructura se hace inabordable mediante la aproximación clásica fundamentada en construir todas las conexiones moleculares mediante enlaces covalentes únicamente. Además, con el desarrollo de campos como la bioquímica o la biología molecular, y el consiguiente avance en el conocimiento de los procesos que los seres vivos desempeñan a lo largo de sus ciclos vitales, la necesidad de desarrollar entidades químicas complejas que llevasen a cabo funciones concretas emergió con mucha fuerza en el seno de la química sintética.²

Es por ello por lo que, durante las últimas décadas, ha surgido un gran interés en el campo de la química supramolecular, que, como su propio nombre indica, se dedica al estudio de las interacciones “más allá de la molécula” discreta.³ A pesar de que este concepto ha sido acuñado hace poco menos de 50 años, sus orígenes son mucho más antiguos, ya que se produjeron a medida que se iban destapando los principios mediante los cuales diferentes moléculas interaccionan entre sí. De esta manera, se comprendieron, poco a poco, las fuerzas débiles que gobiernan este tipo de interacciones no covalentes entre entidades químicas que no están covalentemente unidas.⁴ Si hubiese que proponer un hito en concreto que supusiese el pistoletazo de salida de esta disciplina, este probablemente sería el descubrimiento de las fuerzas de dispersión, en el último cuarto del siglo XIX. Posteriormente, estas interacciones quedarían bautizadas en honor a su descubridor, J. D. van der Waals, pionero en el postulado de estas fuerzas intermoleculares entre gases al ser comprimidos.⁵ Poco después, otro gran nombre propio en la historia de la química como E. Fischer propuso el concepto de reconocimiento enzima-sustrato (conocido como modelo de llave-cerradura), que todavía tiene

¹ K. C. Nicolaou, *Isr. J. Chem.* **2018**, 58, 104-113.

² J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2836-2850.

³ J.-M. Lehn, *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 49-57. J.-M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871-892.

⁴ D. K. Smith, *Soft Matter Science: Historical Overview with a Supramolecular Perspective*. En *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. John Wiley & Sons, Chichester, **2012**.

⁵ J. D. van der Waals, *On the Continuity of the Gaseous and Liquid States* (Tesis Doctoral), Universiteit Leiden, Leiden, (1873).

una gran relevancia en el campo de la química médica hoy en día.⁶ Paralelamente, se definían por parte de Werner los conceptos clave de la química de coordinación, como por ejemplo la idea de valencia o la geometría de los complejos.⁷ Estos postulados le otorgarían el reconocimiento de ser el primer químico inorgánico galardonado con el Premio Nobel (1913).⁸ No fue hasta 1920 cuando se describieron los enlaces de hidrógeno por parte de Latimer y Rodebush,⁹ los cuales son, quizás, las fuerzas intermoleculares más relevantes en el desarrollo de esta tesis doctoral, como se verá a lo largo de esta memoria. Tras este descubrimiento, en la década de los 50 se produjeron dos grandes avances en el campo de la biología como el descubrimiento de la estructura del ADN¹⁰ o el desarrollo de las conocidas como leyes de Corey-Pauling,¹¹ que describen el plegamiento de las proteínas en sus estructuras secundarias conocidas. Ambos fenómenos están gobernados por la formación de enlaces de hidrógeno entre diferentes hebras de ADN a través de la complementariedad de sus bases o entre los diferentes aminoácidos de un polipéptido, respectivamente.

Además de los casos particulares ya descritos, el descubrimiento posterior de otras fuerzas intermoleculares débiles como las interacciones ion-dipolo, dipolo-dipolo, interacciones tipo π , enlace halógeno¹² o enlace calcógeno,¹³ también han supuesto importantes avances en el campo de la química supramolecular, aunque no se tratarán con tanto detalle en este texto.

A pesar de que se introdujo por primera vez el concepto de supra- o súper-molécula (del término alemán *Übermoleküle*) en el año 1937,¹⁴ no es hasta prácticamente tres décadas más tarde cuando este campo despegó definitivamente, con los trabajos de Pedersen, Lehn y Cram, en donde las fuerzas intermoleculares eran claras protagonistas a la hora de diseñar y obtener moléculas de una complejidad desconocida hasta ese momento. Cabe destacar, además, que los campos de la química supramolecular en particular, y de la nanotecnología en general, emergen de manera prácticamente simultánea, ya que este último tiene su nacimiento en torno al año 1960. Es común señalar el origen de esta disciplina en la charla impartida por el físico Richard P. Feynman que fue titulada con la ahora célebre frase “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”,¹⁵ aunque no sería hasta años más tarde cuando se acuñaría el término nanotecnología.¹⁶ Para la preparación del tipo de estructuras (entre 1 y 100 nm) que se estudian en esta ciencia, las cuales presentan unas propiedades muy diferentes a sus análogos macroscópicos, generalmente se consideran dos metodologías fundamentales, conocidas como los procesos *top-down* y *bottom-up*. El primero de ellos se basa en la degradación (generalmente mecánica) de entidades más grandes, mientras que el segundo consiste en hacer interaccionar, de manera programada, átomos o moléculas discretas que se asocian dando lugar a la estructura nanométrica deseada. Las metodologías óptimas en el campo nanotecnológico se encuentran en esta segunda aproximación, debido al mayor control que ofrece en comparación con los procesos *top-down* y, como se puede intuir, el autoensamblaje molecular es uno de los

⁶ E. Fischer, *Ber. Deutsch. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.

⁷ A. Werner, *Zeitschr. Anorg. Chem.* **1893**, 3, 267-330.

⁸ *Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, **1966**.

⁹ W. M. Latimer, W. H. Rodebush, *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, 42, 1419-1433.

¹⁰ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738. M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, 171, 738-740. R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 171, 740-741.

¹¹ L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, 37, 205-211.

¹² P. Metrangola, G. Resnati, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 2511-2519.

¹³ D. J. Pascoe, K. B. Ling, S. L. Cockroft, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 15160-15167.

¹⁴ K. L. Wolf, H. Frahm, H. Harms, *Z Phys. Chem., Abt. B* **1937**, 36, 237-287.

¹⁵ R. P. Feynman, *CalTech’s Engineering and Science Magazine* **1960**.

¹⁶ N. Taniguchi, *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo*, Part II, Japan Society of Precision Engineering, **1974**.

fenómenos más importantes a tener en cuenta a la hora de hacer interaccionar varias moléculas pequeñas para dar lugar a entidades de mayor tamaño y complejidad. Por ello, podríamos considerar que la química supramolecular y la nanotecnología están íntimamente relacionadas, ya que una se nutre de la otra para poder llevar a cabo los procesos de miniaturización¹⁷ que se requieren para el progreso de campos fundamentales en el desarrollo de la humanidad, como por ejemplo la computación.¹⁸

En las últimas décadas, los químicos han sido capaces de descubrir y desarrollar una amplísima variedad de sistemas supramoleculares, así como de aplicarlos para llevar a cabo procesos cada vez más complejos. Por ello, puede considerarse que esta joven disciplina ha sido una de las áreas con mayor crecimiento en el campo de la química en los últimos años, además de contar con una inmensa proyección de cara al futuro. Las posibilidades que ofrece este campo aún son inmensas si consideramos lo alejados que estamos todavía de máquinas supramoleculares tremendamente complejas como los seres vivos. Dada la elevada producción científica en el campo de la química supramolecular, a lo largo de esta introducción se describirán de manera breve algunos conceptos y ejemplos clave para la comprensión de las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral, aunque por cuestiones de espacio no se abarcarán la multitud de sistemas que merecerían una mención en base a su novedad, aplicaciones o elegancia sintética.

1.1. Autoensamblaje y reconocimiento molecular

De manera general, se podría decir que los conceptos de autoensamblaje molecular y de reconocimiento molecular son los dos pilares fundamentales sobre los que se asientan el campo de la química supramolecular. Ambos se basan en la utilización del código que está implícito en la estructura de las entidades químicas para que estas interaccionen entre sí, y que no es otro que la información química que está contenida en sus estructuras en forma de grupos funcionales y su respectiva orientación espacial. Para que dos moléculas se junten dando lugar a una especie supramolecular, estas tienen que poseer grupos complementarios, que se localicen de forma adecuada en la superficie de contacto entre ambas o, lo que es lo mismo, que estén preorganizados topológicamente para que dicha interacción entre unidades complementarias pueda llegar a producirse.

A pesar de que la línea que separa a ambos términos puede ser difusa, en general se engloba dentro del término de reconocimiento a la interacción que se produce entre dos especies de diferente tamaño, donde una de ellas, grande, actúa como recipiente de la otra, mucho menor. La terminología habitual se refiere a las diferentes partes involucradas en este proceso como receptor y sustrato o anfitrión y huésped (*host* y *guest*). Un ejemplo claro de este tipo de interacciones es el reconocimiento de un sustrato biológico en el bolsillo de unión de una proteína, como por ejemplo la unión entre la biotina y la estreptavidina.¹⁹ En este caso, la información codificada en el sitio de unión del anfitrión (geometría, dimensiones y grupos funcionales que expone) restringe el tipo de ligandos que reconoce y, generalmente, dota a estos

¹⁷ C. A. Mirkin, *Small* **2005**, 1, 14-16.

¹⁸ K. E. Drexler, *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*. John Wiley & Sons, Chichester, **1992**.

¹⁹ N. M. Green, *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 51-67.

procesos de una gran selectividad.²⁰ No obstante, es posible que un determinado sustrato sea capaz de inducir un cierto cambio estructural en un receptor, por lo que la geometría de la interacción no tiene por qué ser la de la molécula huésped en estado basal. Este mecanismo se conoce como modelo de ajuste inducido (*induced fit model*) y tiene importantísimas implicaciones en el campo de la bioquímica enzimática.²¹

La selectividad comentada anteriormente está gobernada por un proceso de equilibrio químico, en el que la diferencia de balance energético (ΔG^0) entre la especie complejada y los componentes por separado determina la afinidad con la que estos se unirán. Esta afinidad se basa en la contribución entálpica de las diferentes fuerzas intermoleculares débiles que actúan de manera coordinada, y que deben superar la penalización entrópica que está presente en estos procesos como consecuencia del aumento del orden del sistema al unir varias moléculas que inicialmente estaban separadas. La estabilidad del nuevo complejo se define mediante el parámetro conocido como constante de asociación (K_a), cuyo valor aumenta con la estabilidad termodinámica del sistema *host-guest*.²² Los complejos derivados de este tipo de interacciones pueden mostrar comportamientos muy diferentes a los de ambos componentes por separado o, incluso, dar lugar a sistemas en los que ni el ligando ni el receptor podrían existir por separado,²³ como veremos más adelante. Algún ejemplo ilustrativo de estos fenómenos puede ser la aparición de conformaciones no-convencionales en los sustratos de alguna enzima o la estabilización de estados de transición en las reacciones de una ruta metabólica, cuyos productos no podrían ser obtenidos de manera eficiente si dichas reacciones se realizasen en un medio acuoso simple.

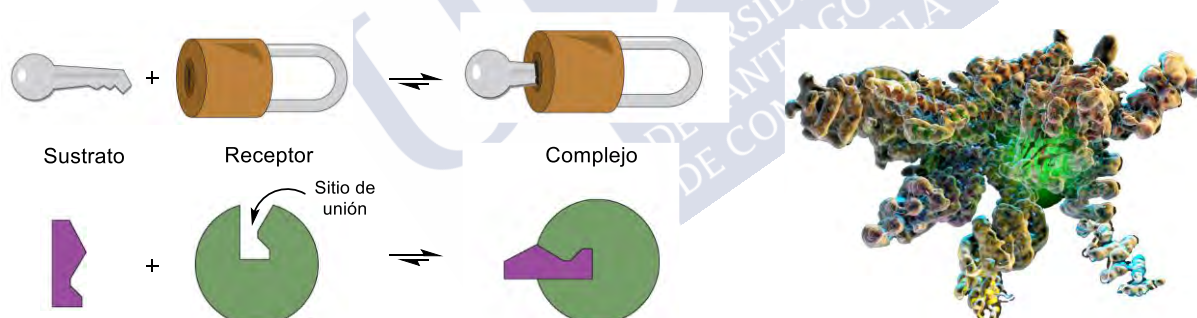


Figura 1. Representación esquemática del proceso de reconocimiento supramolecular en un sistema anfitrión-huésped, ejemplificado (derecha) por medio del sitio activo de la deubiquitinasa Rpn11 (cavidad en verde).

Por otra parte, el autoensamblaje molecular se ocupa de sistemas que, por lo general, abarcan un número mayor de moléculas interaccionando (de manera no covalente) simultáneamente entre sí, independientemente de sus tamaños relativos, y que generan sistemas normalmente más complejos que los descritos en el párrafo anterior. Este aumento de la

²⁰ J. Pleiss, *ChemCatChem* **2014**, 6, 944-950.

²¹ P. E. Wright, H. J. Dyson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 31-38.

²² J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, **2009**.

²³ D. Ajami, L. Liu, J. Rebek Jr., *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 490-499.

complejidad provoca que, en ocasiones, la especificidad pueda verse reducida o modulada, ya que el aumento de las variables que entran en juego puede hacer que el resultado final de la operación de autoensamblaje molecular varíe en función de las condiciones en las que este proceso se lleve a cabo. Se pueden considerar dos tipos de procesos de autoensamblaje, atendiendo a si requieren un aporte de energía para producirse o no. El primero de ellos se denomina autoensamblaje estático, y se produce cuando el sistema se encuentra en condiciones de equilibrio tras alcanzar un mínimo energético y, por lo tanto, no requiere un aporte energético para mantenerse en dicho estado. Por otra parte, se encuentran los procesos de equilibrio dinámico, en el que los sistemas se encuentran fuera del equilibrio y requieren una disipación continua de energía para mantenerse en ese estado ensamblado. A pesar de que a nivel biológico el segundo concepto es mucho más relevante (si atendemos a la maquinaria celular, la inmensa mayoría de los procesos funcionan en ese régimen), a nivel sintético este campo no está ni de lejos tan desarrollado, y podría considerarse que todavía está dando sus primeros frutos dada su elevada complejidad.²⁴ Por ello, la mayoría de los sistemas supramoleculares descritos hasta ahora en bibliografía se encuentran en equilibrio estático y son sobre los que nos centraremos en esta introducción. Es esta línea, ha sido posible preparar supramoléculas en equilibrio que pueden sufrir modificaciones en su estructura a partir de estímulos externos, que modifican las condiciones creando así un nuevo paisaje energético²⁵ y que han permitido hitos tan importantes como la preparación de máquinas moleculares,²⁶ sistemas inteligentes²⁷ o materiales con propiedades de repararse a sí mismos.²⁸

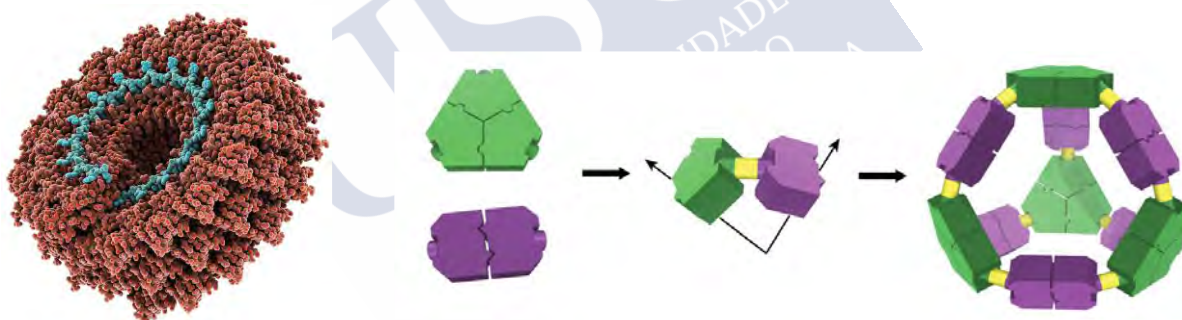


Figura 2. Ejemplos de autoensamblaje molecular. Izquierda: virus del mosaico del tabaco donde una sola cadena de ARN (azul) guía el enrollamiento de más de 2000 unidades proteicas en torno a ella.²⁹ Derecha: Esquema de proteínas de fusión diseñadas para formar esferas tras la dimerización (violeta) o trimerización (verde) de sus subcomponentes.³⁰

Los conceptos de autoensamblaje y reconocimiento molecular a menudo se solapan en la multitud de ejemplos presentes en bibliografía (en un sistema huésped-anfitrión, la molécula de

²⁴ B. A. Gryzbowki, K. Fitzner, J. Paczesny, S. Granick, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 5647-5678.

²⁵ H. Shigemitsu, I. Hamachi, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 740-750.

²⁶ D. A. Leigh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 14506-14508. J. P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 11080-11093.

²⁷ M. Wei, Y. Gao, X. Li, M. J. Serpe, *Polym. Chem.* **2017**, 8, 127-143.

²⁸ Y. Yang, M. W. Urban, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7446-7467.

²⁹ K. Namba, G. Stuubs, *Science* **1986**, 231, 1401-1406.

³⁰ Y. T. Lai, D. Cascio, T. O Yeates, *Science* **2012**, 332, 1129.

mayor tamaño puede ser a su vez una supramolécula autoensamblada), por lo que no se hará una distinción explícita entre ambos a la hora de discutir los diversos ejemplos que se presentarán a continuación. Puesto que la cantidad de bibliografía en esta área excede con creces el alcance de esta memoria, organizaremos esta introducción atendiendo en primer lugar a diferentes ejemplos de sistemas supramoleculares basados en cápsulas moleculares y sus respectivos complejos de inclusión mientras que, posteriormente, nos centraremos en los procesos de autoensamblaje que dan lugar a estructuras monodimensionales de tamaño nanométrico (nanotubos), por ser las dos áreas temáticas más relevantes a la hora de contextualizar los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de esta memoria.

1.2. Sistemas *host-guest*

1.2.1. Receptores moleculares covalentes

Como se ha comentado previamente, se considera que el nacimiento de la química supramolecular moderna se produce a finales de la década de los 60s con los trabajos de Pedersen, Cram y Lehn sobre el descubrimiento de moléculas macrocíclicas que eran capaces de encapsular iones metálicos de los grupos I y II. El pionero de este trío fue Charles Pedersen, quien, en el año 1967, descubrió por serendipia el compuesto dibenzo-18-corona-6 y, posteriormente, otros poliéteres cíclicos cuya unidad repetitiva era el óxido de etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), a los que bautizó como éteres corona. Este nombre proviene de la conformación en la que se disponían rodeando a los iones metálicos a los cuales complejaban con una afinidad asombrosa, debido a la interacción de estos con los pares electrónicos libres de los diferentes átomos de oxígeno. Estos macrociclos mostraban además una dependencia directa entre el tamaño de su cavidad interna y el tipo de ion alcalino o alcalinotérreo con el que interactuaban.³¹ Este revolucionario trabajo sentó las bases del campo y puso de manifiesto que no solo existían productos naturales capaces de complejar este tipo de sustancias,³² sino que era posible preparar compuestos puramente sintéticos que llevaran a cabo este tipo de reconocimiento supramolecular.

Continuando la línea iniciada por Pedersen, el químico francés Jean-Marie Lehn profundizó en el estudio de este tipo de estructuras dotándolas de tridimensionalidad, lo que permitió una complejación en la que el guest estaba más protegido del entorno. Este avance fue posible mediante la introducción de átomos con geometría trigonal como el nitrógeno, frente al uso de exclusivamente átomos de oxígeno.³³ Esta nueva familia de cápsulas tridimensionales se bautizaron como criptandos (criptatos en su forma de complejo metálico), debido al mayor confinamiento de los iones metálicos en su interior que recordaba a una jaula. El atrapado tridimensional supone una mayor afinidad por los sustratos, además de una mayor lipofilia del complejo resultante tras la interacción. Esta estrategia permitió expandir el uso de estas moléculas más allá de los iones metálicos alcalinos y alcalinotérreos, ya que ligeras variaciones

³¹ C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *89*, 7017-7036.

³² N. Rodríguez-Vázquez, A. Fuertes, M. Amorín, J. R. Granja, "Bioinspired Artificial Sodium and Potassium Ion Channels" En *The Alkali Metals Ions: Their Role for Life*, Vol. 16; Springer International, Cham, **2016**.

³³ B. Dietrich, J.-M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2885-2888. B. Dietrich, J.-M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2889-2892.

en los receptores permitieron encapsular otras especies de geometría esférica o tetraédrica como iones amonio, pequeños cationes orgánicos o incluso aniones.³⁴

Inspirado nuevamente por los trabajos pioneros de Pedersen, Donald Cram acuñó un nuevo término en la, hasta ese momento, breve historia de los receptores supramoleculares; concretamente describió una nueva familia de moléculas que nombró esferandos. Estas también exhiben una disposición tridimensional en torno a la molécula huésped, pero su diferencia fundamental es que no derivan del óxido de etileno y, sobre todo, que no tienen que sufrir ningún tipo de modificación conformacional a la hora de interactuar con su ion complementario, ya que desde el momento de su síntesis presentan la geometría adecuada para la formación del complejo. Este hecho se traduce en mejoras sustanciales en las afinidades por los ligandos, ya que no se debe pagar el peaje energético de llevar a la molécula anfitrión a una geometría diferente a la de su estado normal.³⁵ Estos tres autores fueron galardonados con el Premio Nobel de Química del año 1987, por sus trabajos pioneros en esta área de la química supramolecular.³⁶

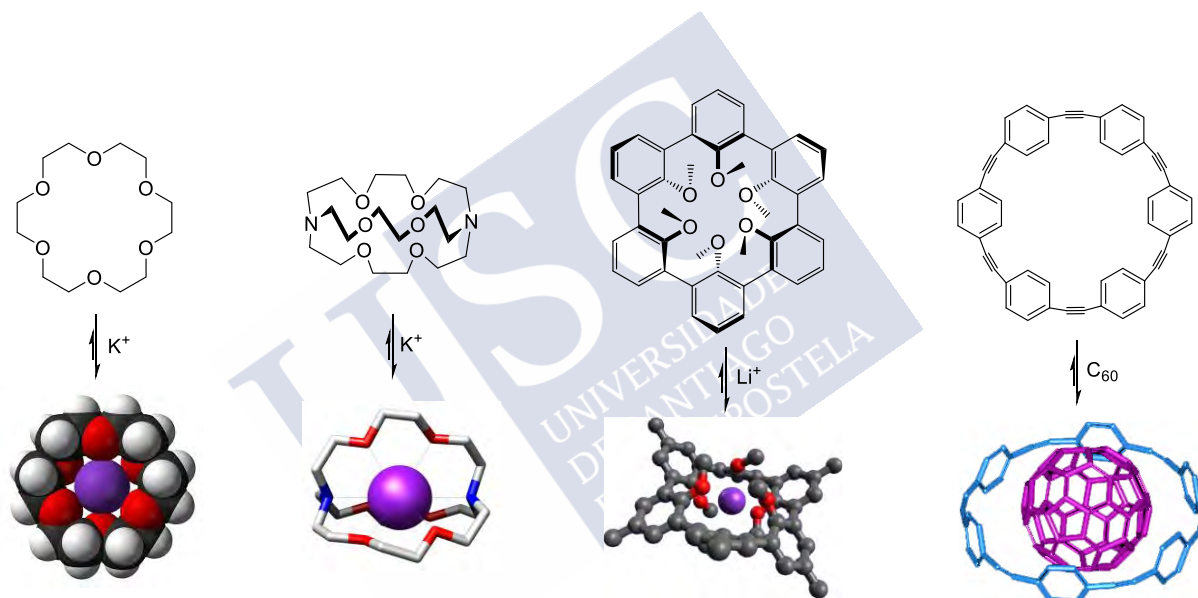


Figura 3. Estructuras de éter corona (15-corona-5), [2.2.2]criptando, esferando y *p*-ciclofano (de izquierda a derecha) y sus respectivos complejos con diferentes huéspedes.

Con posterioridad a estos trabajos seminales se desarrollaron nuevas moléculas cíclicas que eran capaces de complejar moléculas apolares en su interior hidrofóbico y que se conocen como ciclofanos. Su estructura se basa en la presencia de unidades aromáticas que están puenteadas por cadenas alifáticas. El primer artículo en este campo se publicó en 1980 por parte del grupo de Koga, en donde se formaban complejos con *guests* aromáticos.³⁷ Con posterioridad

³⁴ J. Kim, A. S. Ichimura, R. H. Huang, M. Redko, R. C. Philips, J. E. Jackson, J. L. Dye, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10666-10667. V. Amendola, G. Bergamaschi, A. Miljkovic, *Supramolecular Chemistry* **2018**, *30*, 236-242.

³⁵ K. N. Trueblood, C. B. Knobler, E. Maverick, R. C. Helgeson, S. B. Brown, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5594-5596. D. J. Cram, T. Kaneda, T. R. C. Helgeson, G. M. Lein, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6752-6754.

³⁶ Nobel lectures, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1909-1927.

³⁷ K. Odashima, A. Itai, Y. Iitaka, K. Koga, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2504-2505.

se han descrito nuevos ciclofanos diseñados a la carta, los cuales permiten la interacción con huéspedes de diferente naturaleza y en una variedad de disolventes, mediante la modificación de propiedades como el tamaño, la riqueza electrónica o la forma del anillo ciclofánico.³⁸ Avances fundamentales en el campo de las interacciones débiles como el estudio del efecto hidrofóbico³⁹ o la interacción catión- π ,⁴⁰ tienen su origen en este tipo de estructuras.

Dentro de esta clase de receptores covalentes, merecen una mención particular los macrociclos conocidos como pillar[n]arenos, que son *para*-ciclofanos compuestos por un número variable de anillos de benceno ($n = 5-10$) sustituidos por dos grupos alcóxido o hidróxido y unidos entre sí por unidades de metileno (Figura 4).⁴¹ La presencia de grupos fuertemente dadores en su estructura aromática hace que presenten cavidades muy ricas en electrones, lo que los convierte en anfitriones óptimos para la encapsulación de sustancias catiónicas, aunque su uso no se restringe a estos *guests* únicamente. Puesto que pueden presentar un diámetro y sustituyentes⁴² variables en el anillo, es posible modular el comportamiento de la pared aromática, así como su flexibilidad conformacional, lo que los convierte en receptores muy versátiles, pudiendo dar lugar a complejos con más de una molécula huésped en su cavidad.⁴³ A pesar de su relativamente corta existencia (se describieron por primera vez en 2008),⁴¹ este tipo de macrociclos se han utilizado para un sinnúmero de aplicaciones, por lo que, por cuestiones de espacio, se remite al lector interesado en este tema a visitar revisiones bibliográficas recientes en este campo.⁴⁴

Otra mención aparte merece la familia de los cucurbit[n]urilos (CB[n]), los cuales, a pesar de no poder ser estrictamente considerados como ciclofanos (no derivan de anillos aromáticos), presentan características supramoleculares estrechamente relacionadas con las de los pillar[n]arenos. Estos macrociclos de tamaño variable ($n = 5-10$) están compuestos por unidades de glicolurilo conectadas mediante dos puentes de metileno (Figura 4, derecha). A pesar de que CB[6] se conoce desde principios del siglo pasado,⁴⁵ no fue hasta la década de los 80 cuando, a raíz de la resolución de su estructura cristalina,⁴⁶ se disparó la utilización de estas estructuras en química supramolecular. Su cavidad hidrofóbica se complementa en este caso con bordes decorados con grupos carbonilo, lo que permite que se establezcan fuertes interacciones ion-dipolo con moléculas catiónicas y/o hidrofóbicas. La diferencia entre las propiedades de la cavidad y los portales carbonílicos hace posible la orientación precisa de los sustratos que presenten regiones catiónicas e hidrofóbicas, además de propiciar la complejación con una elevada afinidad de sustratos con dos cargas positivas separadas por un grupo apolar.⁴⁷ Este tipo de sustratos es especialmente relevante en química supramolecular acuosa, ya que la formación de complejos de inclusión propicia la liberación de moléculas de agua muy

³⁸ F. Diederich, *Cyclophanes, Monographs in supramolecular chemistry (series editor J. F. Stoddart)*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**. R. Gleiter, H. Hopf (Eds.), *Modern Cyclophane Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.

³⁹ W. Blokzikl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1545-1579.

⁴⁰ D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163-168.

⁴¹ T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5022-5023.

⁴² N. L. Strutt, H. Zhang, S. T. Schneebeli, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2631-2642.

⁴³ T. Ogoshi, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 7937-8002.

⁴⁴ T. Ogoshi, T. Kakuta, T. Yamagishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 2197-2206.

⁴⁵ R. Behrend, E. Meyer, F. I.; Rusche, *Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd*. (Tesis Doctoral), Heidelberg University, Heidelberg, (**1905**).

⁴⁶ W. A. Freeman, W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7367-7368.

⁴⁷ C. Marquez, R. R. Hudgins, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5806-5816. F. Biedermann, O. A. Scherman, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 2842-2849.

energéticas inicialmente alojadas en la cavidad del CB,⁴⁸ lo que comúnmente se conoce como efecto hidrofóbico.⁴⁹ Nuevamente, la cantidad y variedad de guests que estas moléculas pueden albergar en su cavidad, tanto para dar complejos 1:1 como 1:2, 2:1 o 1:1:1, es inmensa y excede el alcance de esta introducción, por lo que no se profundizará más en este tema.⁵⁰



Figura 4. Ejemplos de estructura de pilarareno (izquierda, $n=5$; $R=Me$) y cucurbiturilo (derecha, $n=6$).

A medida que se iba dominando el campo de los receptores covalentes, las ventajas que suponía el confinamiento del sustrato en el interior de la estructura del receptor, protegiéndolo completamente del medio externo, parecía quedar patente frente a las estructuras más abiertas. En esta línea, Cram impulsó un nuevo concepto en el campo de la química supramolecular con el desarrollo de moléculas con forma cóncava que determinaban una cavidad protegida, abierta, únicamente, por un lado, en la que se unían las moléculas de interés. Para sintetizar este tipo de moléculas cóncavas (denominadas cavitandos) se usó inicialmente como unidad fundamental un anillo de resorcin[4]areno (preparado a partir de la condensación de resorcinol con un aldehído, Figura 5) que define la parte más profunda de la cavidad y que se puede modificar con paredes aromáticas de propiedades variables que protejan al *guest*.⁵¹ Estos resorcinarenos en realidad pertenecen a una familia de cavitandos más amplia que se conocen mediante el nombre de calix[n]arenos. Este nombre fue propuesto por su descubridor, David Gutsche, quien fue el primero en determinar su forma de cáliz.⁵² Aparte de resorcinol, pueden tener como unidad repetitiva el fenol o el pirogalol, siempre unidos mediante grupos metileno. No obstante, los calixarenos derivados del fenol, a pesar de ser muy abundantes en bibliografía, no han sido tan explorados en la preparación de cavitandos, ya que sus grupos funcionales hidroxilo se dirigen hacia la punta del cono y no hacia la apertura de la cavidad (al contrario de lo que ocurre con las otras dos familias), por lo que la incorporación de elementos que confinen a los posibles guests es más dificultosa.⁵³

Uno de los cavitandos a los que más atención se ha prestado durante el desarrollo de este campo es al derivado resorcin[4]areno equipado con paredes aromáticas de quinoxalina, que presenta un área lo suficientemente grande para dotar de cierta profundidad a esta molécula y

⁴⁸ F. Biedermann, V. D. Uzunova, O. A. Scherman, W. M. Nau, A. De Simone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318-15323.

⁴⁹ J. Murray, K. Kim, T. Ogoshi, W. Yao, B. C. Gibb, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2479-2496.

⁵⁰ S. J. Barrow, S. Kasera, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320-12406.

⁵¹ J. R. Moran, S. Karbach, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5826-5828.

⁵² C. D. Gutsche, R. Muthukrishnan, *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 4905-4906.

⁵³ X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7794-7839.

poder así albergar diferentes huéspedes en la cavidad aromática (Figura 5).⁵⁴ Fue posible demostrar que si se retiraban dos de los cuatro paneles aromáticos de quinoxalina de las paredes del cáliz, el cavitando resultante era capaz de reconocer una familia de esteroides, en donde se producían importantes diferencias de selectividad en función de la estereoquímica de las diferentes estructuras.⁵⁵ Esta observación es debida al efecto de los grupos hidroxilo libres en las dos unidades de resorcinol no sustituidas por paneles aromáticos, cuya interacción se maximiza con sustratos que exponen grupos polares hacia esas regiones. A pesar de este reseñable reconocimiento diastereoespecífico, los dos sistemas de quinoxalina con dos o cuatro paredes aromáticas presentaban en general afinidades bajas por los sustratos estudiados, así como tiempos de vida media bajos en la cavidad, lo que se achaca a su zona de entrada amplia y, sobre todo, a su libertad conformacional, que provoca que las paredes no permanezcan en el estado que forma la cavidad cónica. Con el objetivo de paliar este problema, se han modificado las aletas aromáticas tanto con grupos amida como con grupos voluminosos que puedan bloquear la salida del ligando. La primera aproximación utiliza el autoensamblaje intramolecular (enlace de hidrógeno entre los diversos grupos amida en la entrada del cavitando) para mantener la integridad estructural de la cavidad,⁵⁶ mientras que el segundo se basa en la restricción en la difusión del *guest* hacia fuera de la cavidad una vez ha sido complejoado.⁵⁷ En ambos casos, el incremento de la afinidad es más bien moderado, pero a nivel cinético se produce un incremento notable en la barrera de activación durante el proceso de abandono de la cavidad.

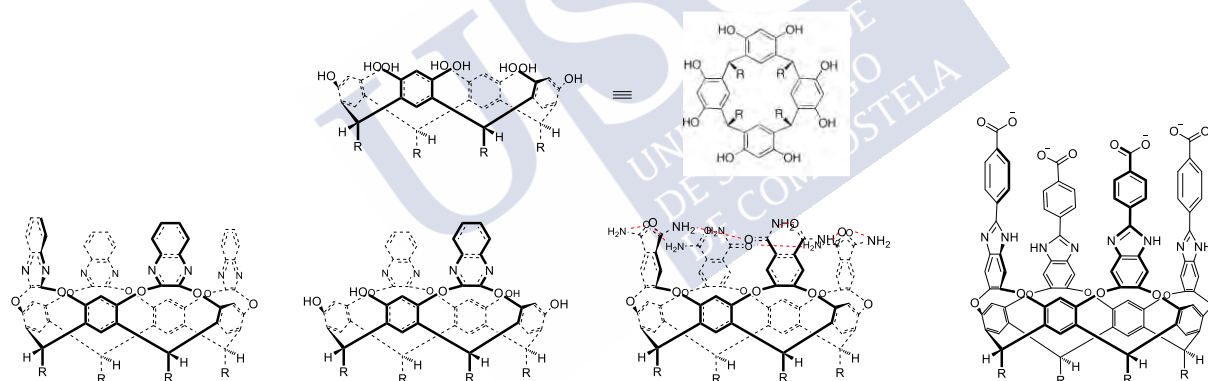


Figura 5. Diferentes cavitandos preparados a partir de una unidad de resorcin[4]areno.⁵⁴⁻⁶⁰

Más recientemente, se han empleado con éxito este tipo de cavitandos basados en resorcin[4]arenos para llevar a cabo reacciones de macrociclación en medios acuosos.⁵⁸ La eficiencia de este proceso se basa en la capacidad de la cavidad para plegar o doblar largas cadenas alquílicas con dos grupos reactivos terminales por su zona media, facilitando el

⁵⁴ P. Soncini, S. Bonsignore, E. Dalcanale, F. Uggozoli, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4608-4612. E. Dalcanale, P. Soncini, G. Bacchilega, F. Uggozoli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 500-502.

⁵⁵ M. Cacciarini, V. A. Azov, P. Seiler, H. Kunzer, F. Diederich, *Chem. Commun.* **2005**, 5269-5271.

⁵⁶ D. Rudkevich, G. Hilmersson, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9911-9912. D. Rudkevich, G. Hilmersson, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12216-12225.

⁵⁷ R. J. Hooley, H. J. Van Anda, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3894-3895.

⁵⁸ Y. Yu, J. Rebek Jr., *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 3031-3040.

contacto entre ambos en la zona de entrada del cavitando⁵⁹ (o entre los dos extremos del *guest* y una molécula bifuncional adicional).⁶⁰ Este comportamiento ha propiciado que los autores se refieran a este tipo de receptores como chaperonas artificiales, ya que aceleran una determinada reacción favoreciendo el plegamiento adecuado del sustrato. Además, esta estrategia se ha explotado para la transformación de moléculas alquílicas bifuncionales en las que existe interés en llevar a cabo una reacción en solamente uno de los grupos reactivos.⁶¹ En este caso, el plegamiento de la molécula lleva a uno de estos grupos a quedar embebido en la cavidad, protegiéndolo así del medio de reacción externo. Además de estos ejemplos representativos que utilizan pilararenos como plataforma, otros calixarenos han sido extensamente modificados y estudiados en su complejación con moléculas más pequeñas. No obstante, a menudo se observa que el reconocimiento es llevado a cabo por especies que derivan del autoensamblaje de varios de estos receptores, por lo que se profundizará en su descripción como moléculas anfitrionas en química supramolecular a lo largo del siguiente apartado.

Llevando un paso más allá el concepto de confinamiento de los huéspedes, en el grupo de Cram describieron por primera vez una molécula polimacrocíclica que rodeaba por completo a otra más pequeña. Esta aproximación se basaba en un proceso de condensación entre dos unidades de resorcin[4]areno en presencia del ligando a encapsular, el cual, tras la formación de los enlaces covalentes que unen ambas tapas, queda totalmente retenido en el interior de la cavidad.⁶² La única forma que este tiene de abandonar la cavidad es la rotura de, al menos, un enlace covalente. Esta característica les valió el nombre de carcerandos (carceplejos en su forma complejada), ya que se puede realizar la analogía entre este sistema supramolecular y un preso que únicamente puede escapar de su celda rompiendo los barrotes que la componen. En este tipo de moléculas se describió por primera vez la orientación específica de un *guest* asimétrico en la cavidad, lo que se bautizó como isomería orientacional.⁶³ A pesar de que este avance supuso toda una revolución conceptual, el interés de estos sistemas es bastante limitado por razones obvias, por lo que se avanzó hacia sistemas en donde el confinamiento fuese modulable. Es así como nacen los hemicarcerandos, que son especies totalmente análogas a los carcerandos salvo por el hecho de que presentan una mayor flexibilidad en la zona de unión entre las bases (portales), lo que permite llevar a cabo el proceso de complejación/descomplejación del *guest* sin tener que romper enlaces covalentes, aunque a menudo se requiere un cierto aporte de energía por motivos cinéticos.⁶⁴ Esta nueva familia de receptores sí ha demostrado una gran versatilidad a la hora de, como se comentaba con anterioridad, emular las condiciones en los centros activos de los enzimas naturales, ya que ha sido posible, por ejemplo, obtener y estudiar por primera vez una molécula de ciclobutadieno a temperatura ambiente en el interior de una de estos receptores polimacrocíclicos.⁶⁵ Esta especie era desconocida en química convencional

⁵⁹ N. W. Wu, I. D. Petsalakis, G. Theodorakopoulos, Y. Yu, J. Rebek Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 15091-15095. N. W. Wu, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7512-7515. S. Mosca, Y. Yu, J. V. Gavette, K.-D. Zhang, J. Rebek Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14582-14585.

⁶⁰ Q. Shi, D. Masseroni, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10846-10848.

⁶¹ D. Masseroni, S. Mosca, M. P. Mower, D. G. Blackmond, J. Rebek Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8290-8293.

⁶² D. Cram, S. Karbach, Y. H. Kim, L. Baczynskyj, K. Marti, R. M. Sampson, G. W. Kallemeyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2554-2560. D. Cram, S. Karbach, Y. H. Kim, L. Baczynskyj, G. W. Kallemeyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2575-2576.

⁶³ P. Timmerman, W. Verboom, F. C. J. M. van Veggel, J. P. M. van Duynhoven, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2345-2348.

⁶⁴ J. R. Moran, S. Karbach, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5826-5828.

⁶⁵ D. J. Cram, M. E. Tanner, R. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1024-1027.

en disolución por su inestabilidad frente a la dimerización, sin embargo, en el interior de la cápsula, esta especie hiperreactiva está protegida de la degradación. De manera similar, ha sido posible estudiar propiedades de encapsulación⁶⁶ o de isomerización⁶⁷ de diferentes sustratos utilizando la protección del medio externo que ofrecen estos sistemas. Con el objetivo de llevar la modulabilidad de estos sistemas hacia nuevas cotas, ha sido posible desarrollar moléculas que respondan a estímulos externos para modificar su estructura pasando así de ser carcerandos a hemicarcerandos (y viceversa), fenómeno que se conoce como *gating*.⁶⁸

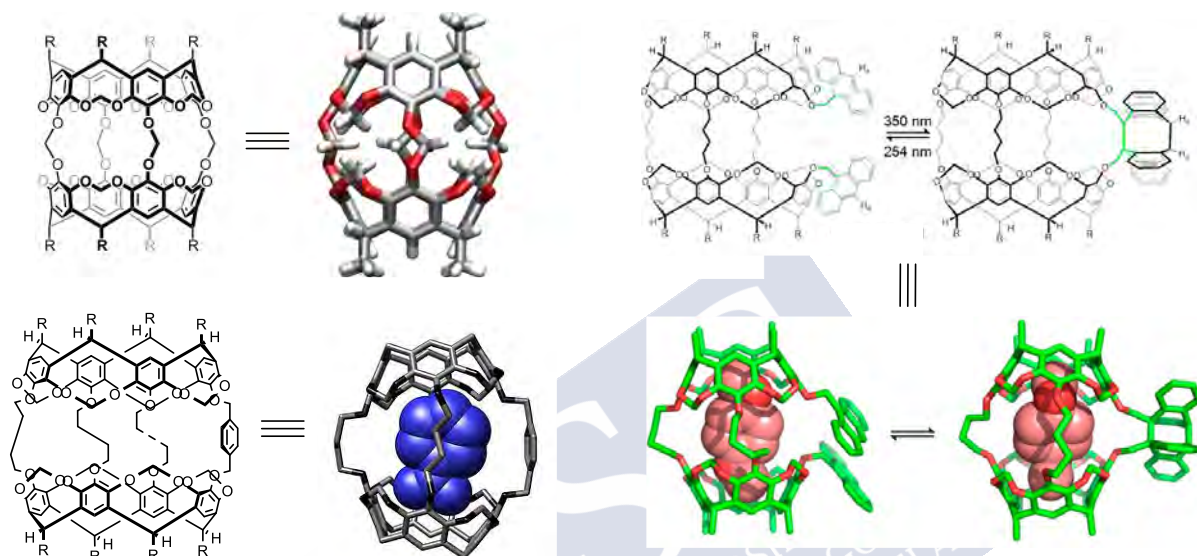


Figura 6. Izquierda: estructuras representativas de un carcerando⁶² (arriba) y un hemicarcerando con su respectivo hemicarceplejo⁶⁴ (abajo). Derecha: proceso de *gating* fotoinducido que permite modificar el comportamiento de un carcerando.⁶⁸

Tras haber comentado las estructuras básicas más representativas a lo largo de la evolución de los receptores supramoleculares covalentes, cabe destacar que, a medida que el campo iba siendo más maduro, (los métodos sintéticos se fueron progresivamente optimizando y se conocieron los principios termodinámicos que están detrás de la formación de los complejos) ha sido posible llevar a cabo nuevos receptores con múltiples cavidades que combinan diferentes receptores.⁶⁹ El resultado se traduce en complejas arquitecturas supramoleculares que son capaces de reconocer sustratos polifuncionales con una afinidad exquisita, hecho que ha tenido importantes consideraciones en el desarrollo de las conocidas como máquinas moleculares, cuyo descubrimiento ha sido reconocido con el Premio Nobel de Química en el año 2016.²⁶

La combinación de cavitandos con otras unidades directoras de la encapsulación ha sido especialmente relevante a la hora de diseñar sistemas que imiten a los metaloenzimas existentes

⁶⁶ R. C. Helgeson, C. B. Knobler, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3229-3244.

⁶⁷ M.-Y. Ku, S.-J. Huang, S.-L. Huang, Y.-H. Liu, C.-C. Lai, S.-M. Peng, S.-H. Chiu, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11709-11712.

⁶⁸ F. Liu, R. C. Helgeson, K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2168-2176.

⁶⁹ W.-B. Hu, W.-J. Hu, Y. A. Liu, J.-S. Li, B. Jiang, K. Wen, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 12130-12142.

en la naturaleza. En este aspecto, cabe destacar que los sistemas naturales utilizan la precisa disposición tridimensional de aminoácidos coordinantes para fijar la primera esfera de coordinación alrededor de un centro metálico y que, además, utilizan las propiedades de confinamiento del sitio activo (segunda esfera de coordinación) del enzima para favorecer la selectividad de las transformaciones que llevan a cabo. De este modo, en las últimas décadas se han desarrollado aproximaciones eficientes que se basan en anclar varios ligandos monodentados (o un número menor de ligandos polidentados) sobre cavitandos que presentan posiciones funcionalizables en sus extremos, de tal manera que, tras coordinar un ion metálico, este quede colocado en el entorno de la cavidad, idealmente proyectando alguna posición de coordinación vacante hacia esta, lo que modula sus propiedades. Esta aproximación tiene importantes implicaciones en el reconocimiento molecular, así como en el campo de la catálisis, ya que se produce una sinergia entre el efecto del centro metálico y el de la cavidad.⁷⁰ Es bastante habitual que se recurra a cavidades basadas en calixarenos o ciclodextrinas,⁷¹ siendo estas últimas las preferidas para utilizar en medios acuosos por su mayor solubilidad, mientras que, para la elección de los ligandos, normalmente se utilizan ligandos tripodales basados en dadores de nitrógeno (aunque también oxígeno y azufre) o incluso en porfirinas, por su gran parecido a los centros de *hemo*-enzimas.⁷²

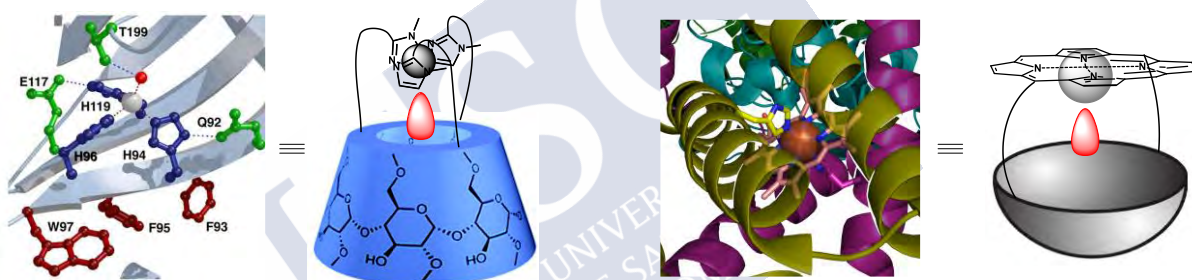


Figura 7. Sistema mimético de la anhidrasa carbónica (izquierda) basado en una tapa de trimetilimidazol anclada a una ciclodextrina⁷³ y otro análogo de la succinato-deshidrogenasa (derecha), donde el grupo hemo se mimetiza con una tapa porfirínica.⁷⁰

Uno de los grupos que más ha contribuido al desarrollo de esta área ha sido el de Olivia Reinaud, quien diseñó una serie de complejos basados en un derivado de calix[6]areno funcionalizado con tres ligandos nitrogenados de tipo piridina o metilimidazol anclados a los anillos 1, 3 y 5 de la cavidad, que dirigían la complejación de centros metálicos sobre la cavidad. Este tipo de sistemas demostró presentar comportamientos dispares en función del tipo de ion metálico que se emplease y de los ligandos que le acompañasen. En general, fue posible obtener los complejos de geometría tetraédrica deseados, en los que la cuarta posición de coordinación se completa con una molécula de disolvente hasta la incorporación de un ligando apropiado. Estos sistemas se han utilizado para complejar aminas, alcoholes, nitrilos o amidas lineales⁷⁴

⁷⁰ J.-N. Rebilly, B. Colasson, O. Bistri, D. Over, O. Reinaud, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 467-489.

⁷¹ D. M. Homden, C. Redshaw, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 5086-5130.

⁷² T. L. Poulos, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 3919-3962.

⁷³ I. Tabushi, Y. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4580-4584.

⁷⁴ O. Sénèque, M. N. Rager, M. Giorgi, O. Reinaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6183-6189. S. Blanchard, L. Le Clainche, M. N. Rager, B. Chansou, J. P. Tuchagues, A. F. Duprat, Y. Le Mest, O. Reinaud, *Angew. Chem. Int.*

así como en procesos redox.⁷⁵ No obstante, estas metaloenzimas artificiales presentan el inconveniente de que el cuarto ligando puede coordinarse con una orientación que no necesariamente tiene porqué estar orientada hacia la cavidad (conocida como posición *endo*), por lo que se desarrollaron otro tipo de ligandos tripodales que restringieran la orientación del ligando exógeno obligándolo a proyectarse hacia la cavidad. Como se ha comentado con anterioridad, es bastante habitual la utilización de ligandos polinitrogenados de naturaleza tripodal como el tren [*tris*(2-aminoetil)amina],⁷⁶ TMPA [*tris*(2-piridilmetil)amina]⁷⁷ o PN₃ [*tris*(2-aminofenil)fosfina]⁷⁸ (Figura 8, derecha). También ha sido posible modular la preferencia por la posición *endo* y *exo* utilizando macrociclos decorados con tapas porfirínicas, donde se han realizado estudios estructura-actividad mediante la modificación del número y la naturaleza de los conectores entre cavitando y porfirina, el metal coordinado y la naturaleza del ligando empleado.⁷⁹ De este estudio se concluye que, dada la presencia de la cavidad cerca del centro metálico, es posible llevar a cabo una diferenciación entre las posiciones de coordinación *endo* y *exo* en centros metálicos hexacoordinados, debido a la estabilización adicional del complejo *endo* por la interacción con la cavidad (Figura 8, centro). Llevando el sistema un paso más allá, ha sido posible el reconocimiento de sustratos ditópicos mediante la funcionalización de ambos bordes de un cavitando gracias a la incorporación de dos sistemas metálicos diferentes (Figura 8, derecha).⁸⁰

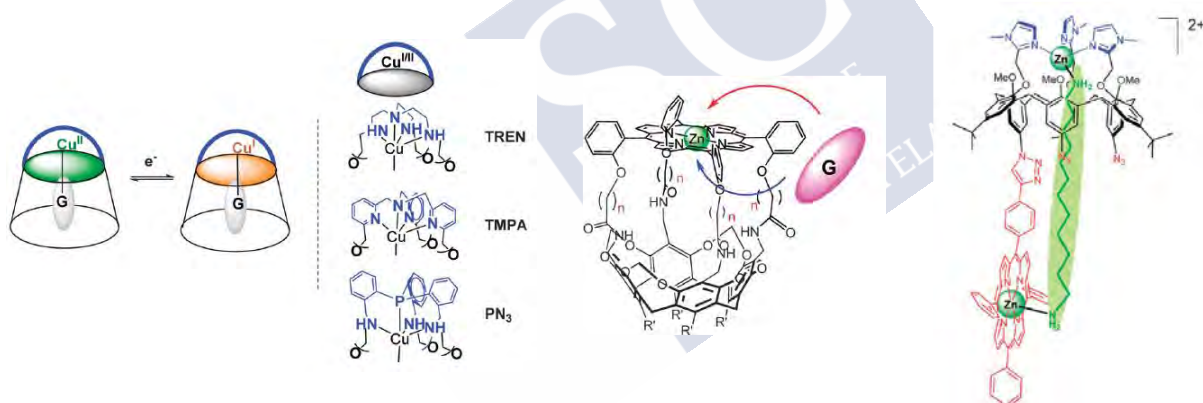


Figura 8. Algunos ejemplos de análogos de metaloenzimas desarrollados en el grupo de O. Reinaud donde se muestran las diferentes estrategias empleadas para la encapsulación selectiva de ligandos hacia la posición *endo*.⁷⁴⁻⁸⁰

Ed. **1998**, 37, 2732-2735. D. Coquière, S. Le Gac, U. Darbost, O. Sénèque, I. Jabin, O. Reinaud, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2485-2500.

⁷⁵ N. Le Poul, M. Campion, B. Douziech, Y. Rondelez, L. Le Clainche, O. Reinaud, Y. Le Mest, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8801-8810.

⁷⁶ I. Jabin, O. Reinaud, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3416-3419.

⁷⁷ X. S. Zeng, D. Coquiere, A. Alenda, E. Garrier, T. Prange, Y. Li, O. Reinaud, I. Jabin, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6393-6402.

⁷⁸ X. S. Zeng, N. Hucher, O. Reinaud, I. Jabin, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6886-6889.

⁷⁹ D. M. Rudkevich, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6585-6587. H. Iwamoto, S. Nishi, T. Haino, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 12670-12672. O. Middel, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3998-4005.

⁸⁰ C. Monnereau, J.-N. Rebilly, O. Reinaud, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 166-175.

Los ejemplos en los que el centro metálico se dispone directamente en el interior de la cavidad y no en el borde de esta (como sucedía en el párrafo anterior) son mucho más escasos, dada la complejidad sintética que supone la obtención de estas cajas covalentes metálicas. No obstante, este tipo de sustratos tiene mucho interés desde el punto de vista de la catálisis, ya que un mayor confinamiento puede dar lugar a selectividades desconocidas fuera de dicha cavidad.⁸¹ No obstante, el diseño de modelos de este tipo no es trivial, ya que a pesar de que se consiga un sistema catalítico que transforme un sustrato encapsulado en otro, el centro activo puede quedar inhibido por la presencia del producto si este no es capaz de salir rápidamente de la cavidad.⁸² En esta línea se han preparado cápsulas derivadas de resorcinarenos en los que una de las aletas laterales se equipa con un punto de coordinación para el centro metálico, las cuales han servido para llevar a cabo reacciones de sustitución alílica mediante química de Pd⁸³ o hidroformilaciones catalizadas por Pt⁸⁴ de manera selectiva (Figura 9, izquierda). El mismo procedimiento se ha aplicado en el campo de la organocatálisis, donde la disposición de grupos carboxilato hacia la cavidad cataliza la ciclación de epoxialcoholes de manera 50 veces más eficiente que sin cápsula⁸⁵ (Figura 9, centro) o la inclusión de superbases como los azafosfatranos en el seno de un hemicarcerando que se utilizó en reacciones de Diels-Alder catalizadas por medio básico (Figura 9, derecha).⁸⁶

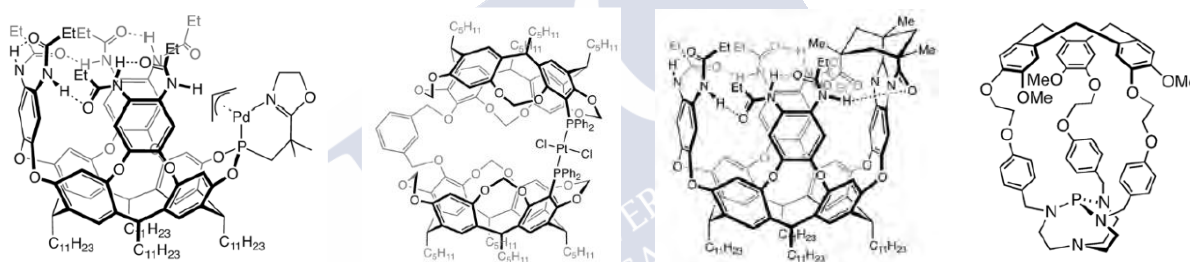


Figura 9. Ejemplos de receptores que incorporan catalizadores metálicos (izquierda) y organocatalizadores (derecha) apuntando directamente al seno de su cavidad.⁸³⁻⁸⁶

A pesar de que existen muchos más receptores covalentes que podrían tener cabida en esta introducción hemos decidido limitarnos a describir únicamente receptores sintéticos cuyo estudio se desarrolle en fase líquida, independientemente de si la disolución es acuosa u orgánica. Por este motivo no quedan recogidos importantes actores en química supramolecular como por ejemplo las ciclodextrinas⁸⁷ (por tratarse de anfitriones naturales) o los entramados

⁸¹ J. Yang, B. Chatelet, D. Héault, J.-P. Dutasta, A. Martinez, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 5618-5628.

⁸² R. J. Hooley, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 202-204.

⁸³ C. Gibson, J. Rebek Jr., *Org. Lett.* **2002**, 4, 1887-1890.

⁸⁴ T. Chavagnan, D. Sémeril, D. Matt, L. Toupet, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 313-323.

⁸⁵ S. R. Shenoy, F. R. P. Crisostomo, T. Iwasawa, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5658-5659.

⁸⁶ B. Chatelet, V. Dufaud, J.-P. Dutasta, A. Martinez, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8684-8688.

⁸⁷ B. V. K. J. Schmidt, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 8350-8369. Special issue, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1741-2076.

metaloorgánicos (MOFs)⁸⁸ o covalentes orgánicos (COFs)⁸⁹, las zeolitas⁹⁰ u otros contenedores moleculares porosos⁹¹ cuya función de reconocimiento de moléculas más pequeñas se desarrolla en estado sólido (generalmente cristalino).

1.2.2. Cápsulas autoensambladas

Con los imparables avances de las últimas décadas en el campo de la química anfitrión-huésped, las posibilidades que ofrecían los receptores formados únicamente mediante enlaces covalentes eran claramente limitadas a la hora de llevar a cabo la preparación de receptores funcionales de gran tamaño. La síntesis enlace a enlace de estructuras tridimensionales de varios nanómetros se hace tremendamente impráctica, por lo que se ha recurrido al uso de interacciones débiles para llevar a cabo la preparación de diferentes receptores supramoleculares complejos que deriven de la interacción supramolecular entre varios subcomponentes. De esta manera, se aúnan los dos conceptos introducidos al inicio de esta sección; por un lado, el autoensamblaje molecular se explota a la hora de diseñar una cápsula constituida por varias moléculas unidas intermolecularmente mediante fuerzas débiles y, por otro, la supermolécula autoensamblada es capaz de ejercer un reconocimiento molecular sobre uno o varios sustratos confinándolos en su interior. No obstante, a la hora de diseñar estructuras tridimensionales complejas mediante interacciones débiles, no todas las fuerzas intermoleculares descritas previamente son igual de útiles, ya que el concepto de direccionalidad adquiere un papel clave. Es por ello por lo que, salvo contadas excepciones, la mayoría de las cápsulas autoensambladas que han sido descritas en bibliografía (y todas las que se cubrirán en esta introducción) se han preparado explotando interacciones derivadas del enlace de hidrógeno o de la química de coordinación, por tratarse de las únicas fuerzas débiles verdaderamente direccionales y “predecibles”.

El hecho de que la mayoría de estos sistemas operen en condiciones de equilibrio dinámico, permite no solo una mayor facilidad a la hora de facilitar la entrada o salida del *guest*, sino también que se pueda producir una modificación de las estructuras de los *hosts* al variar las condiciones externas, lo que hace que aumenten su versatilidad considerablemente. El uso de estas interacciones, como se verá a continuación, ha permitido a los químicos supramoleculares acceder a arquitecturas absolutamente impresionantes, atendiendo a su forma y/o complejidad, cuya preparación sería impensable mediante el uso exclusivo de enlaces covalentes.

El campo de las cápsulas autoensambladas basadas en la química de coordinación, a las que generalmente se conoce como cajas de coordinación, tiene su inicio a principios de la década de 1990 con los trabajos pioneros de Makoto Fujita. Este investigador japonés ha explotado en las últimas décadas las posibilidades que ofrecen los metales de transición a la hora de diseñar estructuras tridimensionales huecas con capacidad de reconocimiento de diferentes sustratos. La ventaja de esta aproximación reside en que, dependiendo del metal que

⁸⁸ H. Furukawa, K. E. Cordova, M. O’Keeffe, O. M. Yaghi, *Science* **2013**, *341*, 1230444. S. Pullen, G. H. Clever, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 3052-3064. J.-R. Li, R. J. Kuppler, H.-C. Zhou, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1477-1504.

⁸⁹ J. Jiang, Y. Zhao, O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3255-3265.

⁹⁰ J. Li, A. Corma, J. Yu, *Chem Soc. Rev.* **2015**, *44*, 7112-7127.

⁹¹ M. Mastalerz, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2411-2422.

se emplee y del tipo ligando que este coordine, se pueden obtener diferentes geometrías de coordinación en la cápsula final. Si se utilizan ligandos politópicos relativamente rígidos y se varía la estequiometría entre los componentes del sistema, se puede generar una plétora de cajas tridimensionales diferentes basadas en formas poliédricas. Además, si los ligandos utilizados presentan cierto carácter bidimensional (2D), la estructura final ofrece posibilidades de confinamiento muy superiores a las que se podrían obtener usando ligandos de tipo listón (1D). Este concepto se bautizó como *molecular paneling*⁹² y generalmente utiliza ligandos aromáticos rígidos (que actúan como caras o aristas de los poliedros), los cuales contienen grupos coordinantes en los extremos para interactuar con los metales (que habitualmente constituyen los vértices de las cajas).

Aunque se había descrito en el pasado algún ejemplo de sistema *host-guest* basado en un receptor autoensamblado mediante enlaces de coordinación, estos sistemas no daban una cobertura total a la molécula huésped, ya que estaban basados en macrociclos de únicamente dos dimensiones.⁹³ Podemos considerar que la primera caja de coordinación que demostró ser capaz de encapsular otras especies más pequeña se describió en el año 1995⁹⁴ y se autoensambló mediante la coordinación de cuatro ligandos *tris*-(4-piridil)-triazínicos con seis unidades del complejo $[\text{Pd}(\text{en})]^{2+}$ lo que dio lugar a una caja octaédrica catiónica (carga total +12), pero con un interior fuertemente hidrofóbico debido a los paneles de triazina que determinaban sus paredes (Figura 10, izquierda). Esta caja demostró ser capaz de complejar ligandos hidrofóbicos en disolución acuosa como el adamantano⁹⁵ (hasta cuatro unidades simultáneamente), así como dos *guests* diferentes simultáneamente.⁹⁶ La utilización de complejos metálicos (Pd y Pt(II)) plano-cuadrados, que orientan dos sitios de coordinación vacantes con un ángulo de 90°, con uno o más ligandos derivados de anillos de piridina o bipyridina ha permitido la obtención de una biblioteca de cápsulas inmensa en los últimos años, de la que incluiremos algún ejemplo representativo a continuación.

La combinación del ligando descrito anteriormente con otro de tipo 4,4'-bipyridina dio lugar a prismas de coordinación de base triangular, en el que las unidades de bipyridina actúan como pilares que conectaban los dos paneles de triazina que servían de base. Esta caja ha servido para confinar huéspedes aromáticos planos de tamaño considerable, como el pireno (Figura 10, izquierda),⁹⁷ metaloporfirinas⁹⁸ o incluso pares de bases de ácidos nucleicos.⁹⁹ Además, dado el carácter modular de este *host*, es posible variar la altura del prisma mediante el alargamiento de los pilares bipyridínicos,¹⁰⁰ lo que permite albergar una cantidad progresiva de moléculas dentro de él. Cabe destacar que, en alguno de estos ejemplos, la presencia de un *guest* apropiado fue necesaria para la formación cuantitativa de la cápsula. Otro ejemplo interesante lo constituye el uso de derivados de *tetrakis*-(3,5-piridina) como ligando para la

⁹² M. Fujita, K. Umemoto, M. Yoshizawa, N. Fujita, T. Kusukawa, K. Biradha, *Chem. Commun.* **2001**, 509-518.

⁹³ A. W. Maverick, S. C. Buckingham, Q. Yao, J. R. Bradbury, G. G. Stanley, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7430-7431. M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5645-5647.

⁹⁴ M. Fujita, D. Oguro, M. Miyazawa, H. Oka, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Nature* **1995**, *378*, 469-471.

⁹⁵ T. Kusukawa, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13576-13582.

⁹⁶ M. Yoshizawa, M. Tamura, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6846-6847.

⁹⁷ M. Yoshizawa, J. Nakagawa, K. Kumazawa, M. Nagao, M. Kawano, T. Ozeki, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1810-1813.

⁹⁸ K. Ono, M. Yoshizawa, T. Kato, K. Watanabe, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1803-1806.

⁹⁹ T. Sawada, M. Yoshizawa, S. Sato, M. Fujita, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 53-56.

¹⁰⁰ Y. Yamauchi, M. Yoshizawa, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5832-5833. Y. Yamauchi, M. Yoshizawa, M. Akita, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 960-966.

formación de nanotubos capaces de albergar *guests* aromáticos de forma alargada.¹⁰¹ Estos ligandos piridínicos polidentados han servido como inspiración para posteriores generaciones de ligandos polipiridínicos dendríticos, los cuales han sido utilizados de manera modulable en la obtención de cajas de coordinación tipo cavitando o tipo nanotubo, dependiendo de las condiciones.¹⁰² Además de las cápsulas poliédricas, el grupo de Fujita y otros grupos han desarrollado otras cajas de tipo esférico que tienen por fórmula M_nL_{2n} donde M es Pd(II) y n puede ser 6¹⁰³, 12¹⁰⁴, 24¹⁰⁵, etc., en los que la estequiometría la dicta el ángulo presente entre las dos unidades de piridina del ligando.¹⁰⁶ También ha habido ejemplos con otro tipo de metales y ligandos que presentan una estequiometría diferente¹⁰⁷ (mayor cantidad de centros metálicos que ligandos). Estos trabajos han desembocado en la reciente obtención de la caja de coordinación más grande descrita hasta la fecha, en donde 48 centros metálicos están unidos a 96 ligandos de bipyridina derivados del 3,4-dimetoxiselenofeno, que posee un ángulo de 152° (Figura 10, derecha).¹⁰⁸

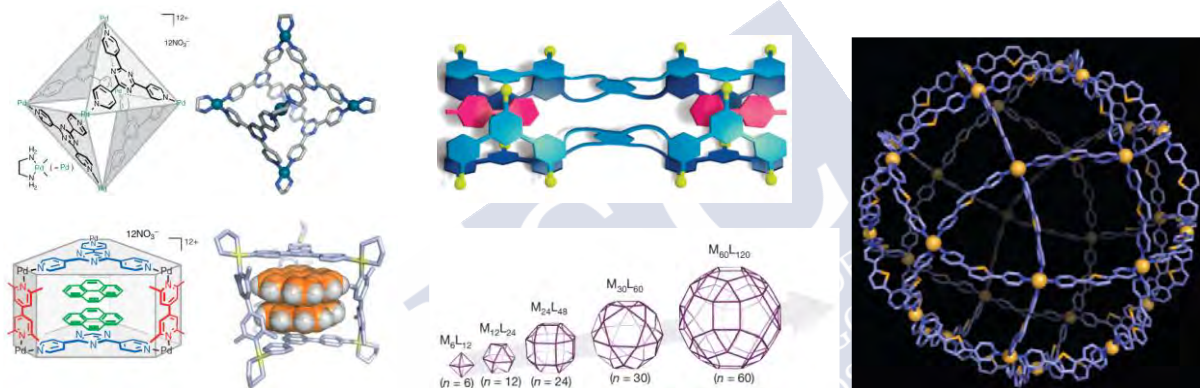


Figura 10. Estructuras de algunas de las cajas de coordinación preparadas por el grupo de Fujita que han sido descritas más arriba.⁹⁴⁻¹⁰⁸

La línea de investigación de las esferas de coordinación de Fujita también ha desembocado en importantes avances en el campo de la funcionalización de la cavidad de estas cajas autoensambladas. Concretamente, se demostró que si se preparaban cajas de coordinación de fórmula $M_{12}L_{24}$ donde L consistía en un núcleo de fenol disustituido con anillos de piridina en las posiciones 2 y 6, el grupo OH del fenol quedaba orientado hacia el interior de la esfera de coordinación ensamblada tras complejarse con iones Pd^{2+} . De esta manera, es posible explotar la nucleofilia del fenol para equipar esa posición con cadenas que modulen las propiedades del interior de la esfera, proceso que se conoce como *endohedral functionalization*

¹⁰¹ M. Aoyagi, K. Biradha, M. Fujita, M. J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 7457-7458.

¹⁰² S. Tashiro, M. Tominaga, T. Kusukawa, M. Kawano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, Angew. Chem. Int. Ed. **2003**, 42, 3267-3270.

¹⁰³ K. Suzuki, M. Tominaga, M. Kawano, M. Fujita, Chem. Commun. **2009**, 1638-1640.

¹⁰⁴ M. Tominaga, K. Suzuki, M. Kawano, M. Fujita, Angew. Chem. Int. Ed. **2004**, 43, 5621-5625.

¹⁰⁵ Q.-F. Sun, J. Iwasa, D. Ogawa, M. Fujita, Science **2010**, 328, 1144-1147.

¹⁰⁶ K. Harris, D. Fujita, M. Fujita, Chem. Commun. **2013**, 49, 6703-6712.

¹⁰⁷ S. Sato, T. Murase, M. Fujita, "Self-Assembly of Coordination Cages and Spheres" En Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials, John Wiley & Sons, **2012**.

¹⁰⁸ D. Fujita, S. Sato, N. Mizuno, T. Kumasaka M. Fujita, Nature **2016**, 540, 563-566.

(Figura 11). En esta línea se han introducido cadenas alquílicas¹⁰⁹ o de etilenglicol¹¹⁰ de diferentes longitudes, que modifican la polaridad de la cavidad en función de su tamaño, además de controlar la encapsulación de *guests* ricos en flúor mediante la incorporación de colgantes perfluorados.¹¹¹ El anclaje de moléculas fotoisomerizables como el azobenceno permite la modulación del tamaño de la cavidad aplicando luz¹¹² y la inclusión de residuos de coroneno mejora enormemente la solubilidad de moléculas poliaromáticas como el C₆₀ en la cavidad.¹¹³ Por último, ha sido posible anclar pequeñas cadenas peptídicas en el interior de estas esferas de coordinación, que le confiere una capacidad única para el reconocimiento de sustratos de manera enantioespecífica. Los autores han definido este ejemplo como un análogo del bolsillo de unión de una proteína natural, ya que se confinan en un volumen relativamente pequeño alrededor de 100 residuos aminoácidos.¹¹⁴

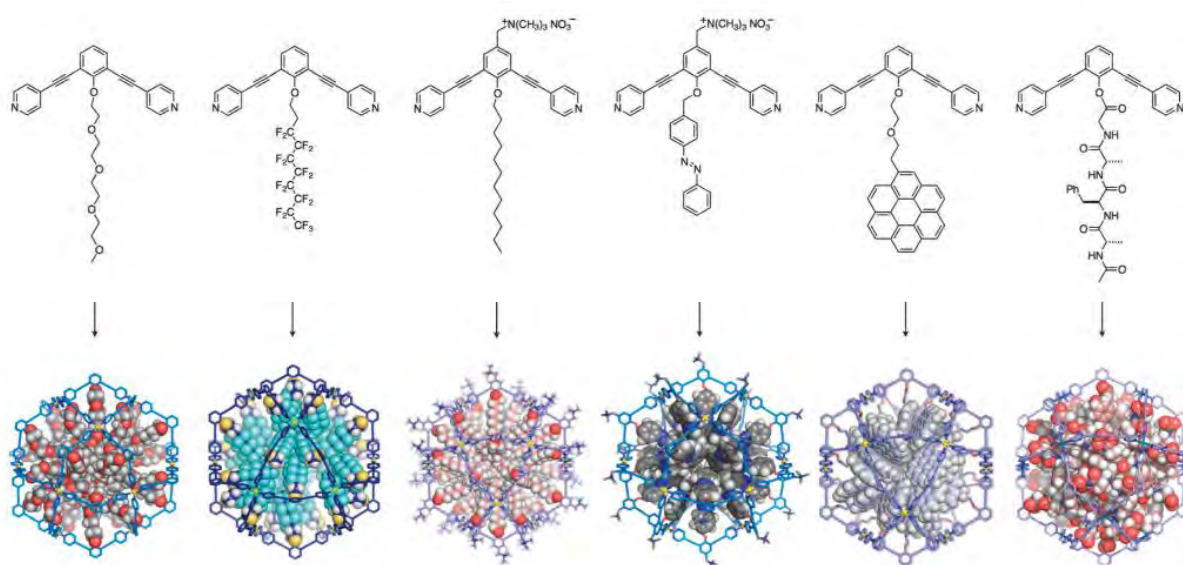


Figura 11. Diferentes funcionalizaciones internas que se han llevado a cabo sobre cajas de coordinación M₁₂L₂₄ por el grupo de Fujita.¹⁰⁹⁻¹¹⁴

La aproximación del *molecular paneling* para la preparación de cajas de coordinación ha sido utilizada por otros grupos para aplicar este tipo de cápsulas en campos como la catálisis. En este campo, cabe destacar los receptores de geometría tetraédrica con fórmula M₄L₆ desarrollados en el grupo de Kenneth Raymond. En esta ocasión, en vez de metales de geometría plano-cuadrada, se utilizan otros de geometría octaédrica (fundamentalmente Ga(III)), mientras que como ligandos se opta por *bis*-catecolatos unidos entre sí por paneles

¹⁰⁹ K. Suzuki, J. Iida, S. Sato, M. Kawano, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5780-5782.

¹¹⁰ M. Tominaga, K. Suzuki, T. Murase, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11950-11951.

¹¹¹ S. Sato, J. Iida, K. Suzuki, M. Kawano, T. Ozeki, M. Fujita, *Science* **2006**, 313, 1273-1276.

¹¹² T. Murase, S. Sato, M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5133-5136.

¹¹³ K. Suzuki, K. Takao, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2544-2545.

¹¹⁴ K. Suzuki, M. Kawano, S. Sato, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10652-10653.

aromáticos basados en el naftaleno¹¹⁵ o pireno¹¹⁶. La mezcla de estos componentes da lugar a las deseadas cajas tetraédricas, en las que la presencia de cuatro centros metálicos *tris*-bidentados hace que la caja presente quiralidad axial (Figura 12). No obstante, con posterioridad, se ha logrado la resolución de cápsulas enantiopuras mediante la incorporación de un grupo quiral sobre el ligando catecol.¹¹⁷ La fuerte carga negativa derivada de los catecolatos (carga neta -12) les confiere solubilidad en medios acuosos y hace que la cavidad presente buena afinidad por ligandos hidrofóbicos (debido a los paneles aromáticos) y/o catiónicos (por su carga intrínseca), como los amonios o fosfonios cuaternarios o el ferroceno.¹¹⁸

Este tipo de sistemas permite que sus paredes “respiren” mediante la rotación de los enlaces amida que unen los paneles aromáticos centrales con los catecolatos coordinantes. Esto hace que, a pesar de que los complejos con especies catiónicas o apolares puedan presentar altos valores de K_a gracias a la entalpía electrostática y al efecto hidrofóbico, respectivamente, su complejación sea modulable a nivel cinético, donde los procesos de entrada y salida de los huéspedes proceden mediante la dilatación de las cavidades de las paredes y no por un desensamblaje del anfitrión. Así, se logra que se asemejen a los enzimas naturales, ya que el confinamiento en torno al centro activo puede modularse para permitir la salida de un cierto producto una vez la transformación biológica ha tenido efecto.

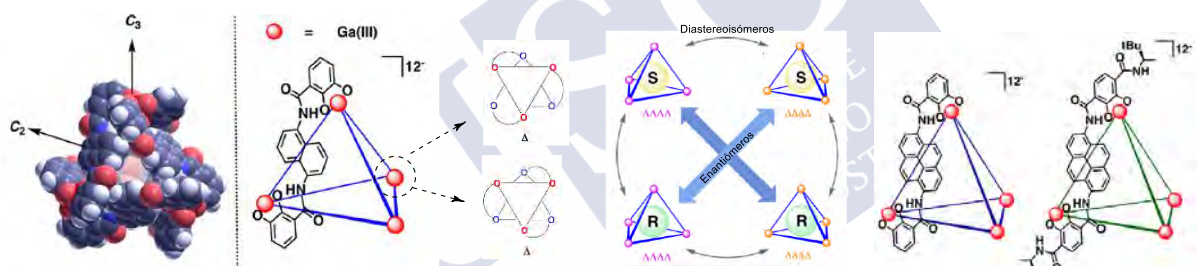


Figura 12. Contribuciones del grupo de Raymond al campo de las cajas de coordinación tetraédricas, donde se muestran los diferentes isómeros que pueden producirse durante la formación de los complejos *host-guest*, así como alguna de las modificaciones llevadas a cabo en las estructuras del *host*.¹¹⁵⁻¹¹⁸

En cuanto a la reactividad obtenida por las cajas (concretamente aquella compuesta de paredes naftalénicas y centros metálicos de Ga^{3+}), se pudo observar que el interior presenta un carácter relativamente ácido, lo que, junto con su afinidad por ligandos catiónicos, permitió acreditar un incremento notable de hasta 4 o 5 unidades en el pKa en algunas bases de Brønsted,¹¹⁹ a la vez que dio pie a observar intermedios de reacción catiónicos que no son

¹¹⁵ D. L. Caulder, R. E. Powers, T. N. Parac, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1840-1842.

¹¹⁶ W. M. Hart-Cooper, C. Zhao, R. M. Triano, P. Yaghoubi, H. L. Ozores, K. N. Burford, F. D. Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 1383-1393.

¹¹⁷ C. Zhao, Q. F. Sun, W. M. Hart-Cooper, A. G. Dipasquale, F. D. Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 18802-18805.

¹¹⁸ M. D. Pluth, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11459-11467.

¹¹⁹ V. M. Dong, D. Fiedler, B. Carl, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14464-14465. J. L. Brumaghim, M. Michels, K. N. Raymond, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4552-4559.

fácilmente detectables en disolución¹²⁰ (Figura 13, izquierda). Siguiendo con la estrategia de utilizar sustratos catiónicos, fue posible llevar a cabo reordenamientos sigmatrópicos sobre un sustrato de alil-enamónio, el cual se transforma mediante una reacción de aza-Cope con una velocidad 850 veces mayor que si la reacción tuviera lugar fuera de la caja. Este resultado se debe a que la caja fuerza al sustrato a adquirir una conformación plegada que se asemeja más al estado de transición que la forma completamente extendida, la cual se observaría de no existir las restricciones derivadas del confinamiento en la cápsula.¹²¹ Además, los autores han demostrado que si se utiliza la caja enantioméricamente pura se pueden lograr valores de exceso enantiomérico (e.e.) de hasta el 80% para estas transformaciones.¹²²

Tras estos buenos resultados, los autores han estudiado multitud de procesos catalíticos¹²³ en el interior de estas cajas tetraédricas, de los cuales cabe destacar aquellos en los cuales la presencia de la caja provoca una reactividad única del sustrato. Un claro ejemplo de ello es el concepto de catálisis divergente, en el que se obtienen productos que no se forman (en cantidades detectables) en disolución cuando la caja actúa como catalizador.¹²⁴ En esta línea son particularmente relevantes sus estudios con sustratos de tipo terpénico, sobre los que han llevado a cabo ciclaciones de Prins (Figura 13, derecha) y de aza-Prins que emulan el comportamiento de los enzimas terpenosintasa.¹²⁵

Otro concepto interesante desarrollado en el grupo de Raymond son los sistemas multicomponente en los que se llevan a cabo transformaciones tándem basadas en la catálisis de la cápsula sinérgicamente con un segundo catalizador.¹²⁶ Con este concepto se han llevado a cabo hidroalcoxilaciones de alenos con catalizadores de Au(I) integrados en la cavidad¹²⁷ o incluso la aceleración de la etapa de eliminación reductora en reacciones de formación de enlace C-C con catalizadores de Pt(IV).¹²⁸ A pesar de que algunos de estos ejemplos derivan de la serendipia, los autores han llevado a cabo extensos estudios que relacionan la estructura y la actividad de las cápsulas mediante modificaciones racionales de todos los componentes que forman la caja de coordinación. De estos estudios se puede concluir que, en líneas generales, una mayor área de los paneles aromáticos (pireno vs naftaleno), o lo que es lo mismo, un mayor confinamiento del sustrato, da lugar a mejoras sustanciales en parámetros como la enantioselectividad y eficiencia de los procesos catalíticos.¹¹⁶ Además, se pudo demostrar que la electronegatividad de la caja (sustitución de Ga(III) por Si(IV)) afecta en gran medida a la eficiencia de las reacciones que transcurren a través de intermedios catiónicos, pero no así a las que mantienen la neutralidad.

¹²⁰ R. A. Moss, M. S. Platz, M. Jones Jr., *Reactive intermediate chemistry*. Wiley-Interscience, Hoboken, **2004**.

¹²¹ D. Fiedler, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6916-6919.

¹²² C. J. Brown, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17530-17531.

¹²³ C. M. Hong, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2447-2455.

¹²⁴ W. M. Hart-Cooper, K. N. Clary, F. D. Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17873-17876. D. M. Kaphan, F. D. Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9202-9205.

¹²⁵ L. Pazouki, Ü. Niinemets, *Front Plant Sci.* **2016**, *7*, 1019-1035.

¹²⁶ Y. Ueda, H. Ito, D. Fujita, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6090-6093.

¹²⁷ Z. J. Wang, C. J. Brown, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7358-7360.

¹²⁸ M. D. Levin, D. M. Kaphan, C. M. Hong, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9682-9693.

¹¹⁶ W. M. Hart-Cooper, C. Zhao, R. M. Triano, P. Yaghoubi, H. L. Ozores, K. N. Burford, F. Dean Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1383-1393.

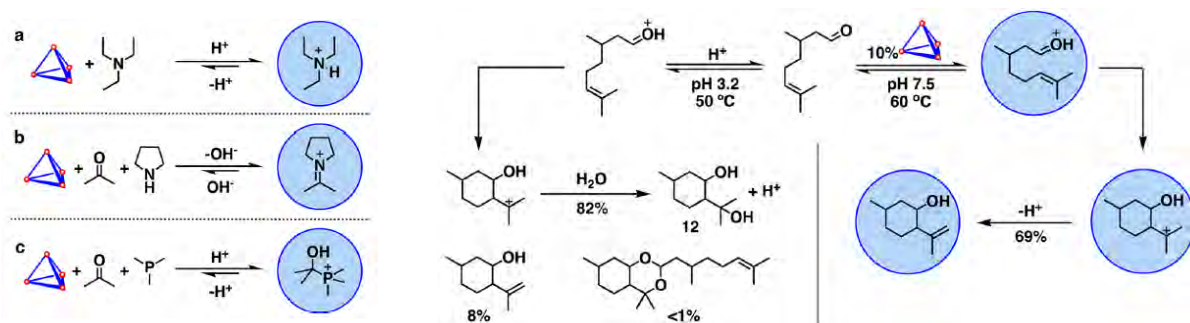


Figura 13. Izquierda: diferencias en el comportamiento ácido-base de diferentes sustratos al encapsularse en la caja de coordinación tetraédrica.¹¹⁹ Derecha: ejemplo de transformación selectiva mediada por la caja tetraédrica.¹²⁴

Los tetraedros de coordinación de estequiometría M_4L_6 no se restringen a los catecolatos de Raymond, sino que otros ligandos *bis*-bidentados han sido utilizados como precursores de cajas supramoleculares. Concretamente, el grupo de Custelcean ha utilizado *bis*-2,2'-bipiridinas cuyo conector incluye un grupo urea, el cual posibilita la inclusión de huéspedes mediante la interacción por enlace de hidrógeno. De esta manera es posible modificar drásticamente la afinidad de la cavidad desde los huéspedes relativamente hidrofóbicos de baja carga a aniones policargados y muy hidrofílicos.¹²⁹

Otro nombre propio en el campo de las cajas de coordinación tetraédricas es el de Jonathan Nitschke, quien ha llevado el concepto un paso más allá al introducir el componente de la química covalente dinámica en el diseño de nuevos ligandos multi-bidentados basados en enlaces imina. Concretamente, se combinan moléculas derivadas de la 2-formilpiridina con *bis*-aminas aromáticas (que acabarán definiendo las aristas o las paredes de la caja) en presencia de sales de metales de geometría octaédrica (Fe, Co, Ni, Zn o Cd(II), que actúan como vértices). Con esta aproximación se obtienen cápsulas metálicas (Figura 14) derivadas de la formación simultánea de enlaces dinámicos de coordinación ($N \rightarrow \text{metal}$) y covalentes ($N=C$).¹³⁰ Al contrario de lo que sucedía con las cajas de Raymond, estas presentan carácter catiónico, ya que derivan de ligandos neutros, lo que propicia la encapsulación de *guests* aniónicos y/o apolares.

Con esta estrategia basada en el autoensamblaje dinámico de varios subcomponentes, la versatilidad de las cajas de coordinación aumenta considerablemente, ya que se puede acceder de manera más fácil a una plétora de aplicaciones que serían inalcanzables con cajas basadas en ligandos puramente covalentes. Entre los ejemplos más relevantes de las cajas tetraédricas dinámicas destacan sus estudios sobre el papel del efecto solvofóbico¹³¹ en la encapsulación de ligandos neutros de manera selectiva al variar el disolvente de estudio.¹³² Otra de las conclusiones de este estudio es que, nuevamente, la elección de ligandos aromáticos de elevada superficie actuando como caras en vez de aristas del tetraedro suponen una mejora notable en la complejación, a la vez que se demuestra que pequeñas variaciones en la estructura de los

¹²⁹ R. Custelcean, P. V. Bonnesen, N. C. Duncan, X. H. Zhang, L. A. Watson, G. van Berkel, W. B. Parson, B. P. Hay, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8525-8534.

¹³⁰ T. K. Ronson, S. Zarra, S. P. Black, J. R. Nitschke, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2476-2490.

¹³¹ M. X. Whitehead, S. Turega, A. Stephenson, C. A. Hunter, M. D. Ward, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2744-2751.

¹³² J. L. Bolliger, T. K. Ronson, M. Ogawa, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14545-14553.

paneles aromáticos pueden suponer grandes cambios en las capacidades *encapsuladoras* de los *hosts* resultantes.¹³³

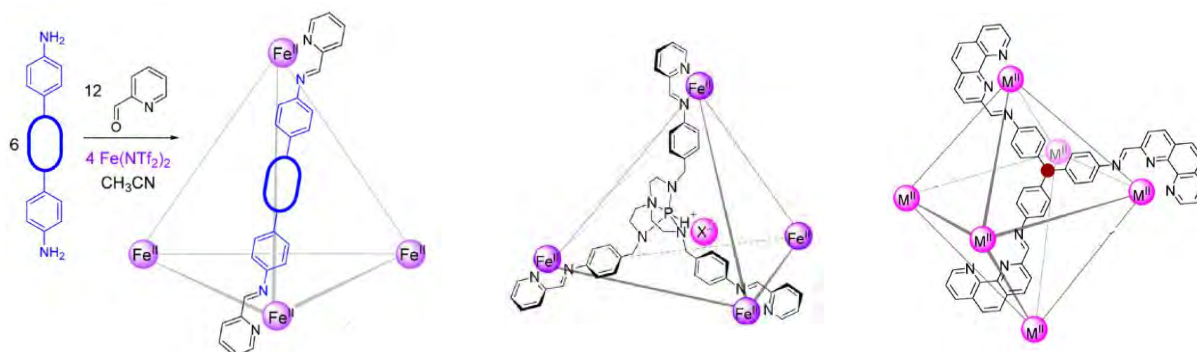


Figura 14. Estrategia de ensamblaje de las cajas de coordinación desarrolladas por el grupo de Nitschke a partir de *bis*- o *tris*-anilinas y 2-formilpiridinas o fenantrolinas con metales octaédricos, en los que los ligandos pueden actuar como aristas o caras del poliedro que se forma.¹³⁰

Otra área de interés desarrollada por el grupo de Nitschke es el reconocimiento de aniones en medio acuoso (a menudo una tarea complicada),¹³⁴ en donde se demostró que las cápsulas tetraédricas son capaces de adaptarse a la presencia de diferentes aniones. Esto se logra reconfigurando su estructura (variando su relación diastereomérica) para maximizar las interacciones mediante enlaces de hidrógeno no-clásicos.¹³⁵ De esta forma, ha sido posible diseñar cajas que actúen como transportadores transmembranales sintéticos de halogenuros,¹³⁶ o incluso otras que sean capaces de extraer iones de interés desde una fase acuosa a otra orgánica.¹³⁷ Por otro lado, estas cajas han sido utilizadas para la estabilización de especies altamente reactivas, como por ejemplo el fósforo blanco (Figura 15, derecha),¹³⁸ y para llevar a cabo transformaciones en su interior, tales como la degradación de agentes neurotóxicos a otras moléculas inocuas (Figura 15, izquierda)¹³⁹ o la transformación de sustratos muy sencillos hacia otras moléculas de alto valor sintético en una sola etapa de manera selectiva un sistema catalítico tipo “relé”.¹⁴⁰

¹³³ T. K. Ronson, A. B. League, L. Gagliardi, C. J. Cramer, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15615-15624.

¹³⁴ N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom, P. A. Gale, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8038-8155.

¹³⁵ J. K. Clegg, J. Cremers, A. J. Hogben, B. Breiner, M. M. J. Smulders, J. D. Thoburn, J. R. Nitschke, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 68-76. R. Custelcean, P. V. Bonnesen, N. C. Duncan, X. Zhang, L. A. Watson, G. Van Berkel, W. B. Parson, B. P. Hay, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8525-8534.

¹³⁶ A. B. Grommet, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6294-6297.

¹³⁷ D. Zhang, T. K. Ronson, J. Mosquera, A. Martinez, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3717-3721.

¹³⁸ P. Mal, B. Breiner, K. Rissanen, J. R. Nitschke, *Science* **2009**, *324*, 1697-1699.

¹³⁹ J. L. Bolliger, A. M. Belenguer, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7958-7962.

¹⁴⁰ A. G. Salles Jr. S. Zarra, R. M. Turner, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19143-19146.

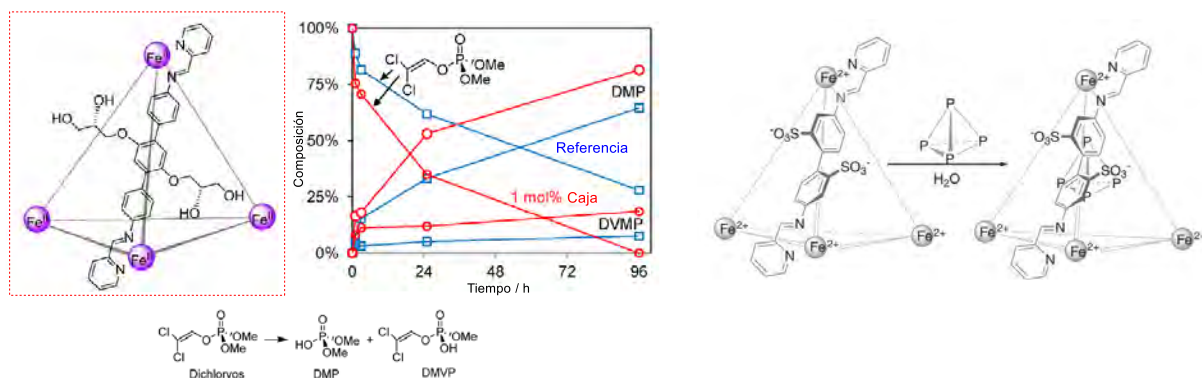


Figura 15. Aplicaciones de las cajas de coordinación dinámicas como aceleradores de la degradación de agentes tóxicos (izquierda)¹³⁹ o estabilizadores de especies sensibles como el fósforo blanco (derecha).¹³⁸

Las contribuciones del grupo de Nitschke no se reducen únicamente a las cajas de coordinación tetraédricas, ya que han explotado otro tipo de geometrías. Entre ellas destacan los sistemas heterometálicos que dan lugar a cubooctaedros en los cuales un tipo de metal determina los vértices del cubo mientras que el otro se sitúa en el centro de los lados.¹⁴¹ La presencia de estos nuevos centros metálicos ha sido explotada para dotar a las cajas de nuevas funciones, entre la que destaca la formación de cavidades de dimensiones muy grandes que pueden acomodar múltiples *guest* en su interior¹⁴² o dar cabida a aniones de gran tamaño,¹⁴³ para los que no existen apenas receptores. Se demostró que cajas de dimensiones similares, pero con paredes más porosas, no son capaces de retener estos *guest* en su interior, por lo que la presencia del ion metálico central es clave a la hora de generar un nuevo punto de anclaje en el lado del cubo para ligandos aromáticos de elevada superficie. Otro ejemplo muy elegante en la utilización de esta estrategia se logró al utilizar como paredes de un cubo de coordinación una metaloporfirina de Zn, que presenta una nueva posición de coordinación para ligandos nitrogenados. Este nuevo centro metálico fue empleado con éxito para dirigir la encapsulación de un péptido que contiene un residuo de histidina y protegerlo así de la degradación por parte del enzima tripsina.¹⁴⁴

El uso de metaloporfirinas para la formación de cajas de coordinación no ha sido exclusivo de este grupo, ya que su elevada superficie, así como la posibilidad de complejar diferentes metales en su posición central y su geometría C_2/C_4 , que permite la modificación de sus extremos con dos o cuatro grupos coordinantes a otro centro metálico que actúe de vértice, las convierte en una unidad presente en muchos diseños de cajas.¹⁴⁵ Algunos ejemplos en este área involucran la síntesis, purificación o identificación de diferentes alótropos de fullereno,¹⁴⁶ la utilización de los metales centrales para inmovilizar un catalizador en una posición

¹⁴¹ D. Zhang, T. K. Ronson, J. R. Nitschke, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2423-2436.

¹⁴² F. J. Rizzuto, L. K. S. von Krbek, J. R. Nitschke, *Nature Rev. Chem.* **2019**, *3*, 204-222.

¹⁴³ W. J. Ramsay, F. T. Szczypinski, H. Weissman, T. K. Ronson, M. M. Smulders, B. Rybtchinski, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5636-5640.

¹⁴⁴ J. Mosquera, B. Szyszko, S. K. Ho, J. R. Nitschke, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14882-14887.

¹⁴⁵ S. Durot, J. Taesch, V. Heitz, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8542-8578.

¹⁴⁶ W. Brenner, T. K. Ronson, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 75-78.

determinada de la cavidad,¹⁴⁷ o incluso la internalización de otra unidad de metaloporfirina en la cavidad¹⁴⁸ con implicaciones importantes en catálisis. Otros grupos como el de Anderson¹⁴⁹ o Hupp¹⁵⁰ han preparado cajas y anillos poliporfíricos explotando la selectividad de coordinación que presentan los diferentes centros metálicos de las metaloporfirinas. Adicionalmente, ha sido posible combinar dos tipos de ligandos diferentes¹⁵¹ o incluso usar complejos organometálicos tipo sándwich como aristas durante el ensamblaje de la caja,¹⁵² en un espectacular ejercicio de diseño que demuestra un gran conocimiento sobre de las interacciones que mantienen unidas estas cajas de coordinación.

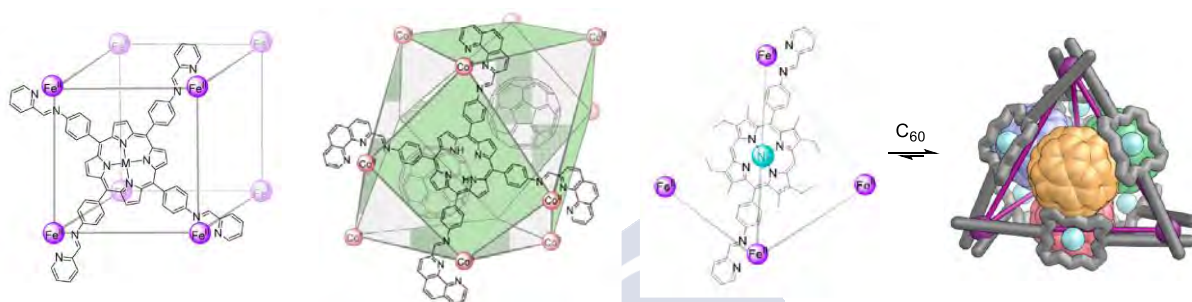


Figura 16. Cajas de coordinación en los que los ligandos preparados se basan en una unidad de porfirina y que tienen importantes aplicaciones en el campo del reconocimiento de los diferentes alótropos de fullereno.¹⁴²

Además de los nombres propios destacados previamente, existen muchos otros grupos que han desarrollado otros modelos de caja de coordinación y merecen ser citados brevemente como por ejemplo los metalocoronatos de Saalfrank,¹⁵³ quien también ha diseñado criptandos¹⁵⁴ basados en enlaces de coordinación junto con Dalcanele,¹⁵⁵ el grupo de Chad Mirkin, que ha sido pionero en el campo de la utilización de ligandos lábiles para la generación de cápsulas metálicas con cavidades modulables (conocido como WLA de sus siglas *Weak-Ligand*

¹⁴⁷ C. García-Simón, R. Gramage-Doria, S. Raoufmoghaddam, T. Parella, M. Costas, X. Ribas, J. N. H. Reek, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2680-2687.

¹⁴⁸ M. Otte, P. F. Kuijpers, O. Troeppner, I. Ivanovic-Burmazovic, J. N. H. Reek, B. de Bruin, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10170-10178.

¹⁴⁹ P. S. Bols, H. L. Anderson, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2083-2092.

¹⁵⁰ S. J. Lee, K. L. Mulfort, X. Zuo, A. J. Goshe, P. J. Wesson, S. T. Nguyen, J. T. Hupp, D. M. Tiede, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 836-838.

¹⁵¹ M. Schmittel, B. He, P. Mal, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2513-2516. S. K. Samanta, M. Schmittel, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3108-3115. Y. R. Zheng, Z. G. Zhao, M. Wang, K. Ghosh, J. B. Pollock, T. R. Cook, P. J. Stang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16873-16882.

¹⁵² Y. F. Han, Y. J. Lin, L. H. Weng, H. Berke, G. X. Jin, *Chem. Commun.* **2008**, 350-352. N. P. E. Barry, P. Govindaswamy, J. Furrer, G. Süss-Fink, B. Therrien, *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, *11*, 1300-1303. N. P. E. Barry, M. Austeri, J. R. M. Lacour, B. Therrien, *Organometallics* **2009**, *28*, 4894-4897.

¹⁵³ R. W. Saalfrank, N. Löw, F. Hampel, H.-D. Stachel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2209-2210.

¹⁵⁴ R. W. Saalfrank, A. Dresel, V. Seitz, S. Trummer, F. Hampel, M. Teichert, D. Stalke, C. Stadler, J. Daub, V. Schunemann, A. X. Trautwein, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 2058-2062.

¹⁵⁵ P. Jacopozzi, E. Dalcanele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 613-615.

Approach)¹⁵⁶ o Ward y sus cápsulas polimórficas basadas en ligandos de bis-pirazolilpiridina.¹⁵⁷

Como mencionábamos al inicio de esta sección, la utilización de complejos metálicos para el autosamblaje de cavidades funcionales no ha sido la única estrategia utilizada en la preparación de cápsulas, puesto que también se ha explorado la utilización del enlace de hidrógeno para llevar a cabo el autoensamblaje de varios subcomponentes que conformen una cápsula con propiedades definidas. Podemos considerar que esta rama de la química supramolecular comienza a principio de la década de 1990 con las contribuciones de Julius Rebek Jr. La primera observación de un complejo de inclusión en una cápsula autoensamblada sin mediación de centros metálicos se produjo en 1993, cuando se pudo observar la inclusión de pequeños hidrocarburos en la cavidad determinada por un dímero derivado de un *bis-glicolurilo* ensamblado mediante enlaces de hidrógeno entre sus bordes complementarios.¹⁵⁸ Las dos unidades de glicolurilo estaban unidas por espaciadores relativamente rígidos y provocaban el plegamiento de cada monómero para que ambas mitades se pudieran adaptar formando la cápsula, de una manera análoga a las dos mitades de una pelota de tenis.¹⁵⁹ Las variaciones en las estructuras de las moléculas anfitrión, así como su estudio con una biblioteca de ligandos, puso de manifiesto que el grado de ocupación de la cavidad por parte del huésped es un factor que afecta en gran medida a la afinidad. Tras numerosos estudios se pudo concluir que la relación óptima entre el volumen de la cavidad de la cápsula autoensamblada y el volumen de la molécula encapsulada se sitúa en torno al 55%. Este descubrimiento significó un gran avance en el campo de los complejos *host-guest* y en el diseño racional de sistemas funcionales a partir de ese momento. De hecho, este descubrimiento se conoce como la “regla del 55% de Rebek”.¹⁶⁰

Este grupo también ha analizado en detalle el proceso de encapsulación con cavitandos autoensamblados que generan anfitriones de cavidades cilíndricas. Para ello, utilizaron resorcin[4]arenos similares a los descritos en la Sección 1.2.1 de esta Introducción, aunque en este caso las paredes aromáticas estaban compuestas por unidades de diazaftalimida, de tal manera que en la apertura de la cavidad se exponen cuatro unidades de imida que propician la unión entre dos cavitandos mediante su autoensamblaje por enlaces de hidrógeno (Figura 17, izquierda). A lo largo de 20 años han ido profundizando en el estudio de estos cavitandos y han obtenido resultados realmente sorprendentes, como veremos a continuación.

Estas cavidades diméricas se ensamblaban únicamente en presencia de huéspedes que se organizan de manera apropiada en su cavidad, exhibiendo una selectividad muy notable. Posteriormente se pudo estudiar el ensamblaje en presencia de alcanos lineales cuya longitud se asemejaba (C₆-C₁₀) a las dimensiones de la cápsula. Sin embargo, se observó también que alcanos cuyas dimensiones en la conformación puramente extendida (observable en disolución) excedían las de la cápsula (C₁₁-C₁₄), adquirirían una conformación helicoidal que reducía la longitud neta de la molécula, demostrada por la presencia de efectos nOe entre las posiciones metilénicas *i* e *i*+4.¹⁶¹ Este enrollamiento sobre sí mismo, a pesar de presentar un coste

¹⁵⁶ A. M. Lifschitz, M. S. Rosen, C. M. McGuirk, C. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7252-7261.

¹⁵⁷ M. D. Ward, C. A. Hunter, N. H. Williams, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2073-2082.

¹⁵⁸ N. Branda, R. Wyler, J. Rebek Jr., *Science* **1994**, *263*, 1267-1268.

¹⁵⁹ R. Wyler, J. de Mendoza, J. Rebek Jr., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1699-1701.

¹⁶⁰ S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1016-1022.

¹⁶¹ D. Ajami, J. Rebek Jr., *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 87-90.

²³ D. Ajami, L. Liu, J. Rebek Jr., *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 490-499.

energético derivado de las interacciones *gauche*, se compensaba con el resto de las interacciones favorables entre huésped y anfitrión. Estos resultados constituyen uno de los primeros ejemplos de lo que se conoce con el término *soft templating*.²³ Este concepto involucra la existencia de complejos en los que ni el *host* ni el *guest* existen en disolución separadamente y su existencia solo tiene cabida como complejos supramoleculares. En este caso, el *host* no se puede aislar en forma dimérica sin un *guest* apropiado y el alcano helicoidal solo es estable dentro de la protección de la cápsula cilíndrica autoensamblada.

Este fenómeno ha sido explotado para generar cápsulas cilíndricas extendidas, ya que para alcanos de más de 14 carbonos la cavidad derivada de la cápsula dimérica presentaba unas dimensiones insuficientes. Para ello, los autores incluyeron otro componente en el sistema, concretamente unidades de glicolurilo con una disposición de dadores-aceptores de enlace de hidrógeno complementaria a los extremos imídicos del cavitando. Con este nuevo componente, existe la posibilidad de que el cilindro se expanda en vertical mediante la inserción de varias unidades de glicolurilo entre las tapas de resorcin[4]areno, si la longitud del huésped así lo requiere.¹⁶² De esta forma se pudo aumentar la longitud de los alcanos hasta C₂₁ con la adición de un cinturón de glicolurilos. Con posterioridad, se han llegado a describir cápsulas hiperextendidas que contienen hasta tres anillos de glicolurilos (para huéspedes de más de 24 átomos de carbono),¹⁶³ que incluso pueden llegar a presentar formas angulares¹⁶⁴ (Figura 17, derecha) si son ensambladas en presencia de guests apropiados en disolventes no competitivos. La adición de los cinturones de glicolurilo presenta un comportamiento modulable, ya que su protonación puede provocar su pérdida de capacidad para insertarse y, por tanto, el pH del medio externo puede usarse como un efector que provoque la compresión de ciertos ligandos desde su forma extendida (con cinturón) hacia su forma helicoidal comprimida (sin cinturón).¹⁶⁵ También se ha llevado a cabo la *N*-metilación de los glicolurilos, que provoca el “cortocircuito” del autoensamblaje y fuerza el paso de cápsulas a cavitandos extendidos con un único cinturón de alargadores.¹⁶⁶

Otras estructuras basadas en resorcinarenos han sido utilizadas para dar lugar a cápsulas autoensambladas, pero en lugar de basar su autoensamblaje en la interacción de paneles aromáticos laterales, se han introducido grupos que actúen como dadores o aceptores de enlace de hidrógeno en la posición 2 del resorcinol. En esta línea se han preparado fenoxiderivados¹⁶⁷ y otros carboxiderivados, que se autoensamblan gracias a la presencia de anillos de protones o unidades de 2-aminopirimidina¹⁶⁸/tetrahidro-2-pirimidona¹⁶⁹, respectivamente (Figura 18, izquierda).

¹⁶² D. Ajami, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5314-5315.

¹⁶³ D. Ajami, J. Rebek Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9283-9286.

¹⁶⁴ K. Tiefenbacher, D. Ajami, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12003-12007.

¹⁶⁵ D. Ajami, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15038-15039.

¹⁶⁶ Y. Yamauchi, D. Ajami, J.-Y. Lee, J. Rebek Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9150-9153.

¹⁶⁷ R. G. Chapman, J. C. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9081-9082. J. Trotter, J. C. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6252-6260.

¹⁶⁸ K. Kobayashi, T. Shirasaka, K. Yamaguchi, S. Sakamoto, E. Horn, N. Furukawa, *Chem. Commun.* **2000**, 41-42.

¹⁶⁹ M. Yamanaka, K. Ishii, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8800-8806.

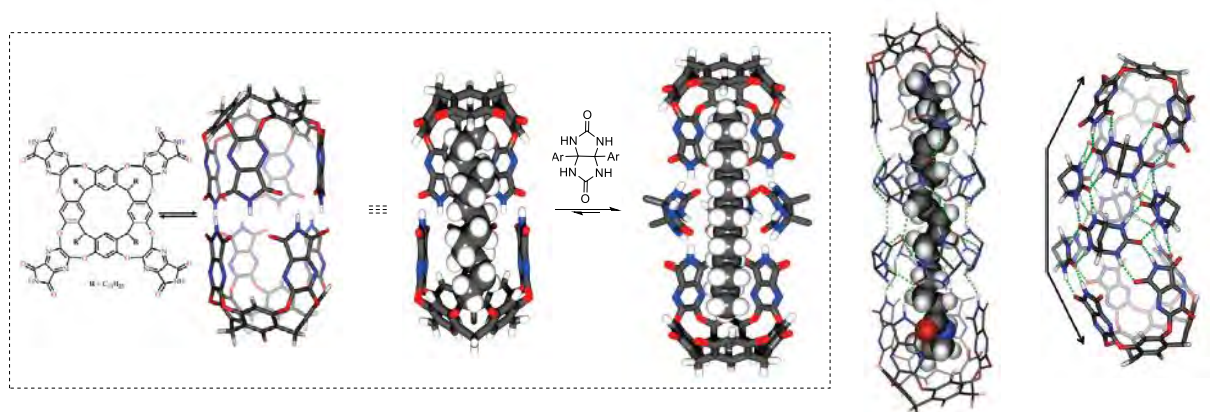


Figura 17. Cápsulas autoensambladas mediante enlace de hidrógeno desarrolladas por Rebek mediante la metodología *soft template* que permite alargar la cavidad mediante la inserción de cinturones de glicolurilos si la longitud de los *guests* así lo requiere.¹⁶²⁻¹⁶⁶

Estas cápsulas presentan cavidades más amplias y porosas que las desarrolladas por Rebek, lo que supone que se reducen considerablemente las interacciones CH- π durante el proceso de complejación. En consecuencia, juegan un papel relevante las interacciones del *guest* con los protones del puente metileno que une las diferentes unidades de resorcinol, los cuales presenta carga parcial positiva y favorecen las interacciones con iones halogenuro¹⁷⁰ o con moléculas que contengan grupos carbonilo correctamente orientados,¹⁷¹ lo que ha sido explotado en su química *host-guest*. La posición 2 del anillo de resorcinol también ha servido como punto de anclaje para aminoácidos, que dirigen la dimerización mediante la interacción entre su grupo amonio y carboxilato. Esta cápsula autoensamblada presentaba afinidad por ligandos cargados e hidrofílicos, ya que la presencia de los aminoácidos en la zona ecuatorial no solo unía ambos hemisferios sino que también proyectaba grupos polares hacia el interior de la cavidad dirigiendo la encapsulación de huéspedes como el ácido málico, con el que presentaban una complementariedad en la formación de enlaces de hidrógeno.¹⁷² Los grupos de Reinhoudt y Kobayashi han ido un paso más allá y han preparado cápsulas heterodiméricas combinando los 2-carboxioresorcinarenos¹⁷³ y 2-fenoxioresorcinarenos¹⁷⁴ anteriores con otro cavitando basado en un resorcinareno que contiene anillos de piridina (Figura 18, derecha), de tal manera que se forme enlace de hidrógeno entre ambas unidades. Estas cápsulas heterodiméricas han sido capaces de encapsular bencenos 1,4-disustituídos asimétricos con una orientación definida en la cavidad, los cuales demostraron ser un ejemplo más de isomerismo orientacional.^{63,175}

¹⁷⁰ C. L. D. Gibb, E. D. Stevens, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5849-5850.

¹⁷¹ N. Nishimura, K. Yoza, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 777-790. H. Kitagawa, Y. Kobori, M. Yamanaka, K. Yoza, K. Kobayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 10444-10448.

¹⁷² A. Szumna, *Chem. Commun.* **2009**, 4191-4193. A. Szumna, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12381-12388.

¹⁷³ I. Higler, L. Grave, E. Breuning, W. Verboom, F. de Jong, T. M. Fyles D. N. Reinhoudt, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *9*, 1727-1734.

¹⁷⁴ K. Kobayashi, R. Kitagawa, Y. Yamada, M. Yamanaka, T. Suematsu, Y. Sei, K. Yamaguchi, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3242-3246.

¹⁷⁵ K. Kobayashi, K. Ishii, S. Sakamoto, T. Shirasaka, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10615-10624. K. Kobayashi, K. Ishii, M. Yamanaka, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4725-4734.

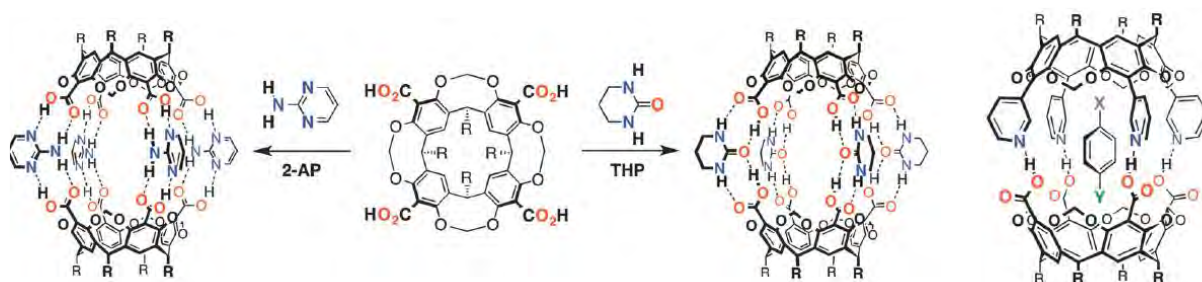


Figura 18. Cápsulas autoensambladas basadas en resorcin[4]arenos funcionalizados en la posición 2 del anillo.

El trabajo pionero de Atwood demostró que un calix[4]areno derivado del resorcinol era capaz de autoensamblarse en presencia de agua para dar lugar a complejos hexaméricos de morfología pseudo-esférica mediante la formación de 60 enlaces de hidrógeno.¹⁷⁶ Con posterioridad, modificaciones sutiles de esta estrategia permitieron la obtención de una cápsula que presentaba grupos hidroxilo apuntando a la cavidad y formando enlaces de hidrógeno con el disolvente encapsulado¹⁷⁷ (Figura 19, izquierda). Este se considera el primer ejemplo de cápsula autoensamblada con funcionalización interna. Otros calix[4]arenos derivados del fenol también han sido equipados con grupos capaces de interactuar mediante enlace de hidrógeno en la parte abierta del cono que determinan, concretamente en la posición 4 del anillo de fenol. Este tipo de moléculas, diseñadas para mantenerse en la forma cónica, han servido para autoensamblarse mediante grupos urea autocomplementarios¹⁷⁸ (Figura 19, derecha) dando lugar a una cápsula dimérica que presenta propiedades muy diferentes de polaridad en su interior. Esto se debe a que el ecuador es polar (debido a la presencia de las ureas) mientras que el interior del cono es muy hidrofóbico, lo que de nuevo proporcionaba orientaciones muy definidas de los diferentes *guest* en la cavidad. Esta estrategia se ha utilizado en presencia de sulfonilureas¹⁷⁹ o fenilureas,¹⁸⁰ las cuales dan lugar a cápsulas heterodiméricas.

Los calix[4]pirroles presentan una alternativa interesante al uso de calix[4]arenos, ya que la presencia de anillos de pirrol en vez de fenol permite que actúen como donadores de enlace de hidrógeno de manera más eficiente. A pesar de que en condiciones normales el núcleo tetrapirrólico tiende a estar en la conformación 1,3-alternada,¹⁸¹ es conocido que en presencia de huéspedes apropiados se puede producir un cambio conformacional que disponga los cuatro grupos NH del pirrol hacia la cavidad para maximizar las interacciones con estas moléculas. Este tipo de receptores ha sido ampliamente utilizado como cavitando, en donde también se ha

¹⁷⁶ P. Timmerman, W. Verboom, F. C. J. M. van Veggel, J. P. M. van Duynhoven, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2345-2348.

¹⁷⁷ L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Nature* **1997**, *389*, 469-472.

¹⁷⁸ J. L. Atwood, L. J. Barbour, A. Jerga, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4837-4841.

¹⁷⁹ K. D. Shimizu, J. Rebek Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 12403-12407.

¹⁸⁰ R. K. Castellano, B. H. Kim, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12671-12672.

¹⁸¹ O. Mogck, V. Böhmer, W. Vogt, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8489-8496.

¹⁸² P. Ballester, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3261-3277.

explorado la posibilidad de aumentar el confinamiento de la cavidad incorporando paredes aromáticas en la posición *meso*, que aumenten la profundidad de la cavidad.¹⁸²

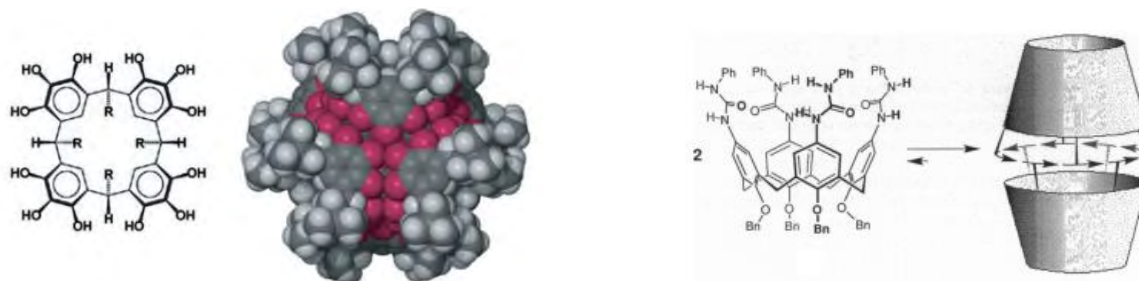


Figura 19. Complejo hexamérico basado en un monómero de resorcin[4]areno desarrollado por Atwood¹⁷⁷ y cápsula dimérica de calixarenos derivados de fenilureido-fenol de Rebek.¹⁷⁸

En particular, se han estudiado las interacciones de numerosos derivados calixpirrólicos con sustancias aniónicas¹⁸³ o incluso con pares salinos, ya que la parte externa del cono puede estabilizar los cationes mediante interacciones cation- π ¹⁸⁴ o se puede incluso cerrar la parte externa del cavitando con derivados de éteres corona u otras estructuras ricas en heteroátomos que faciliten la complejación de cationes simultáneamente.¹⁸⁵ Además de actuar como cavitandos, estos macrociclos han sido utilizados para la preparación de cápsulas supramoleculares, donde los trabajos del grupo de Pablo Ballester han sido pioneros. Inicialmente, se pudo demostrar que los calix[4]pirroles podían formar agregados hexaméricos similares a los descritos para calix[4]arenos por Atwood^{176,177} si se incluían anillos aromáticos en la posición *meso* que tuviesen posibilidad de formar redes de enlace de hidrógeno.¹⁸⁶ Con posterioridad, fue posible limitar la agregación a cápsulas diméricas mediante el uso de grupos aromáticos de urea,¹⁸⁷ los cuales dimerizaban nuevamente mediante el llamado “cinturón de ureas” y que demostraron ser buenos anfitriones para ligandos tipo *bis-N*-óxido de tamaño adecuado (Figura 20, derecha). Este reconocimiento se basaba en la interacción de ambos extremos aniónicos de manera simultánea con los conos de tetrapirrol, en los cuales se estabilizaba el anión por enlace de hidrógeno.¹⁸⁸ Esto supuso una ventaja fundamental con respecto al uso de otros cavitandos como unidad monomérica, además de que el volumen interno era ligeramente mayor en este caso. Con posterioridad se demostró que la interacción con los *N*-óxidos no tenía por qué ser sinérgica, sino que era posible encapsular dos monómeros

¹⁸² A. Jana, S. Bähring, M. Ishida, S. Goeb, D. Canevet, M. Sallé, J. O. Jeppesen, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 5614-5645. L. Escobar, G. Aragay, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 13682-13689.

¹⁸³ D. E. Gross, F. P. Schmidtchen, W. Antonius, P. A. Gale, V. M. Lynch, J. L. Sessler, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7822-7827.

¹⁸⁴ R. Custelcean, L. H. Delmau, B. A. Moyer, J. L. Sessler, W.-S. Cho, D. Gross, G. W. Bates, S. J. Brooks, M. E. Light, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2537-2542.

¹⁸⁵ I.-W. Park, J. Yoo, B. Kim, S. Adhikari, S. K. Kim, Y. Yeon, C. J. E. Haynes, J. L. Sutton, C. C. Tong, V. M. Lynch, J. L. Sessler, P. A. Gale, C.-H. Lee, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 2514-2523.

¹⁸⁶ G. Gil-Ramírez, J. Benet-Buchholz, E. C. Escudero-Adán, P. Ballester, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3820-3821.

¹⁸⁷ P. Ballester, G. Gil-Ramírez, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 10455-10459.

¹⁸⁸ A. Galán, E. C. Escudero-Adán, P. Ballester, *Chem. Sci.* **2017**, 8, 7746-7750.

con este grupo funcional a la vez¹⁸⁹ o incluso co-encapsular dos *guests* diferentes simultáneamente.¹⁹⁰

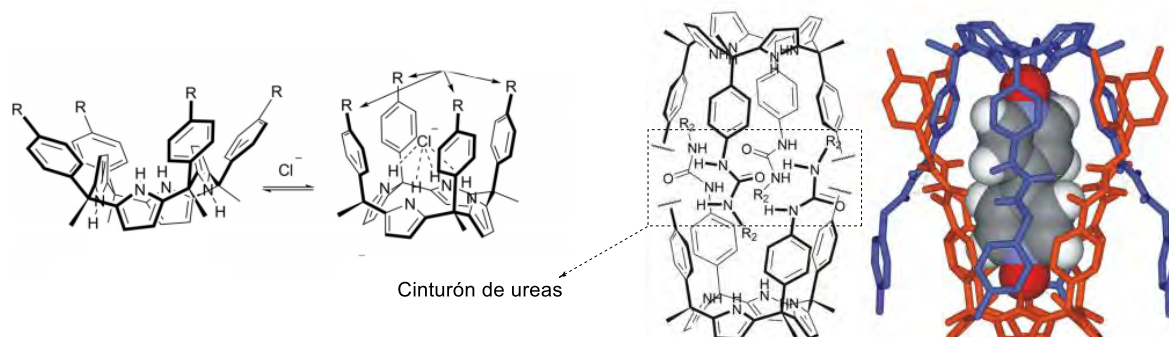


Figura 20. Estructuras de los dos isómeros de los calix[4]pirroles en donde la sustitución de los grupos R permite la incorporación de grupos que favorezcan la dimerización y la posterior encapsulación de *guests* bifuncionales, como los *bis-N*-óxidos (derecha).¹⁸⁷

Cabe destacar que la utilización de enlaces metálicos y de hidrógeno para el ensamblaje de una cápsula supramolecular no son excluyentes entre sí, ya que existe algún ejemplo en bibliografía que explota de manera simultánea ambas aproximaciones. Por ejemplo, se han utilizado resorcin[4]arenos de simetría C_{2v} que contienen dos grupos 4-piridilo y otros tantos 3-carbamoilfenilo¹⁹¹ o 3-octilureidofenilo¹⁹² que se autoensamblan en presencia de sales de Pd y Pt combinando ambas interacciones.

1.3. Nanotubos basados en el autoensamblaje de subcomponentes

Como se ha comentado anteriormente, en el campo de la nanotecnología existe la necesidad creciente de desarrollar materiales con propiedades definidas de dimensiones nanométricas, para lo que generalmente se recurre a estrategias *bottom up* basadas en aproximaciones supramoleculares para la preparación de este tipo de estructuras. En esta línea, desde el nacimiento de esta disciplina se ha logrado obtener multitud de topologías tridimensionales, como las cajas anteriormente descritas, esferas,¹⁹³ cubos,¹⁹⁴ barriles¹⁹⁵ o

¹⁸⁹ G. Gil-Ramirez, M. Chas, P. Ballester, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2520-2521.

¹⁹⁰ A. Galán, V. Valderrey, P. Ballester, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6325-6333.

¹⁹¹ M. Yamanaka, M. Kawaharada, Y. Nito, H. Takaya, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16650-16656.

¹⁹² M. Yamanaka, N. Toyoda, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9880-9881.

¹⁹³ A. R. Stefankiewicz, J. K. M. Sanders, *Science* **2010**, *328*, 1115-1116.

¹⁹⁴ A. Stephenson, M. D. Ward, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 10360-10369.

¹⁹⁵ Y. Lim, M. J. Lee, *Mater. Chem.* **2011**, *21*, 11680-11685.

nanoflores,¹⁹⁶ bidimensionales como láminas,¹⁹⁷ monodimensionales como nanohilos¹⁹⁸ o nanotubos¹⁹⁹ o incluso de dimensión cero, como los clústeres metálicos²⁰⁰ a partir de sustratos orgánicos o inorgánicos. De todos estos ejemplos nos centraremos en exclusiva en el campo de los nanotubos autoensamblados, que es la arquitectura empleada en el desarrollo de los sistemas químicos descritos dentro de esta tesis doctoral.

La utilización de nanotubos en nanociencia comienza con el descubrimiento de los nanotubos de carbono en el año 1991.²⁰¹ Desde ese momento, este tipo de estructuras inorgánicas han sido uno de los actores principales en este campo debido fundamentalmente a sus propiedades electrónicas y mecánicas.²⁰² Sin embargo, a nivel químico, estas estructuras presentan importantes problemas como su baja solubilidad en la mayoría de los disolventes habituales, la cual está causada por una gran tendencia a la agregación y desemboca en una escasa biocompatibilidad. Otro destacado problema reside en que los métodos de obtención de estas nanoestructuras no permiten su obtención de manera eficiente y controlada atendiendo a sus dimensiones y propiedades químicas, lo que ha terminado por limitar su uso. Es por ello por lo que desde el campo de la química supramolecular se ha recurrido al proceso de autoensamblaje para desarrollar nuevos modelos nanotubulares que presenten las propiedades adecuadas de las que carecen los nanotubos de carbono, como por ejemplo una mejor solubilidad, biocompatibilidad y control sobre sus dimensiones y propiedades químicas, tanto internas como externas. En esta línea se han postulado varias alternativas para la obtención de nanotubos originados a partir de la interacción entre subunidades más sencillas que, en la mayoría de los casos, son estrategias inspiradas en procesos de autoensamblaje presentes en la naturaleza.

El primero de estos ejemplos consiste en el plegamiento de moléculas lineales en forma de hélice, de tal manera que la estructura plegada final determine una cavidad hueca. Esta aproximación tiene su origen en el plegamiento de péptidos naturales. A pesar de que la mayoría de las estructuras helicoidales naturales no presenta una cavidad interna lo suficientemente grande como para considerarlas nanotubos huecos, existe algún ejemplo natural de polipéptidos que se ensamblan en hélices β (más anchas que las α) como las gramicidinas.²⁰³ Esta familia de antibióticos peptídicos, dependiendo del medio en el que se ensamblen, pueden adoptar estructuras helicoidales huecas que funcionan como toxinas perturbando la homeostasis de ciertos microorganismos. A nivel sintético, se han desarrollado moléculas artificiales que están diseñadas para plegarse de una manera específica, a las cuales se las conoce como foldámeros. Algunos ejemplos relevantes en este campo han sido las hélices basadas en β y γ péptidos lineales,²⁰⁴ las hélices basadas en ácido cólico²⁰⁵ y, sobre todo, los foldámeros aromáticos

¹⁹⁶ J. Cui, S. Jia, *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 352, 249-263.

¹⁹⁷ W. Huan, Y. Sunami, H. Kimura, S. Zhang, *Nanomaterials* **2018**, 8, 519-539. W. Zhao, J. Peng, W. Wang, S. Liu, Q. Zhao, W. Huang, *Coord. Chem. Rev.* **2018**, 377, 44-63.

¹⁹⁸ R. Bian, L. Meng, M. Zhang, L. Chen, H. Liu, *ACS Omega* **2019**, 4, 1816-1823.

¹⁹⁹ R. García-Fandiño, M. Amorín, J. R. Granja, *Synthesis of Supramolecular Nanotubes*. En *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; John Wiley & Sons Ltd.; Chichester, **2012**.

²⁰⁰ Z. Luo, A. W. Castleman Jr., S. N. Khanna, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 14456-14492.

²⁰¹ S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56-58.

²⁰² R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* **2002**, 297, 787-792.

²⁰³ D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 2011-2025.

²⁰⁴ I. Huc, H. Jiang, "Organic foldamers and helices". En *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Eds. P. A. Gale, J. W. Steed, John Wiley & Sons. Chichester, **2012**.

²⁰⁵ Y. Zhao, Z. J. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17894-17901.

basados en 1,3-oligofenilenos.²⁰⁶ Este último ejemplo ha sido particularmente atractivo ya que las unidades bencénicas pueden unirse entre sí mediante diferentes conectores (acetilenos,²⁰⁷ amidas,²⁰⁸ hidrazidas,²⁰⁹ etc.) y, además, el sustituyente en la posición 2 del anillo queda directamente orientado hacia el interior de la hélice, lo que lo convierte en plataformas muy versátiles que permiten una cierta funcionalización interna.

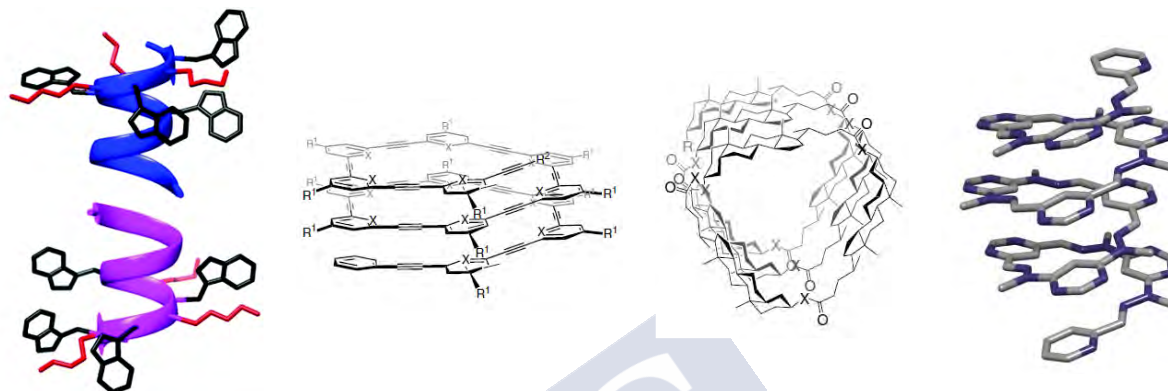


Figura 21. Aproximaciones supramoleculares basadas en foldámeros lineales que se pliegan dando lugar a estructuras helicoidales con cavidades internas. A la izquierda se muestra la estructura secundaria de la gramicidina A, que se considera la fuente de inspiración biológica de este tipo de nanotubos.²⁰³

Otra aproximación para la preparación de estructuras tubulares de dimensiones nanométricas consiste en el ensamblaje de moléculas con forma de cilindro o listón, tratando de emular las proteínas que adoptan una estructura de barril β a partir de secuencias peptídicas con una estructura secundaria de lámina β , como por ejemplo la α -hemolisina (Figura 22, izquierda).²¹⁰ En el desarrollo de estructuras sintéticas basadas en este mecanismo asociativo destacan los trabajos del profesor Stefan Matile, que ha diseñado una serie de polibisfenoles *para*-conectados, los cuales, si se decoran con otros grupos en las posiciones 2 y 5 del anillo, pueden ensamblarse en torno a una cavidad (Figura 22, centro),²¹¹ como veremos más adelante. Existen otros ejemplos muy elegantes, aunque de menor alcance, como por ejemplo el ensamblaje de macrociclopéptidos con regiones precursoras de hélice α y lámina β (Figura 22, derecha).²¹²

La siguiente estrategia que se ha adoptado es la utilización de moléculas que se ensamblan formando láminas en primera instancia para luego enrollarse sobre sí mismas como un pergamino dando lugar a una cavidad definida. Esta aproximación es análoga al proceso

²⁰⁶ D.-W. Zhang, X. Zhao and Z.-T. Li, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1961-1970.

²⁰⁷ M. T. Stone, J. M. Heemstra, J. S. Moore, *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 11-20.

²⁰⁸ Y. Ferrand, I. Huc, *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 970-977.

²⁰⁹ D.-W. Zhang, Z. Zhao, J.-L. Hou, Z.-T. Li, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 5271-5316.

²¹⁰ L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, *Science* **1996**, 274, 1859-1866.

²¹¹ N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 354-1365.

²¹² Y.-B. Lim, K.-S. Moon, M. Lee, *Angew Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1601

mediante el cual una lámina de grafeno se enrolla para dar lugar a un nanotubo de carbono de pared simple (Figura 23, izquierda).²¹³

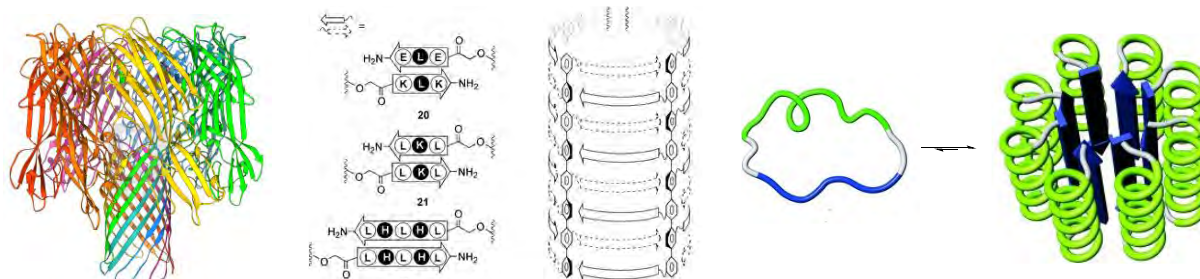


Figura 22. Nanotubos basados en la formación de barriles supramoleculares, como por ejemplo la α -hemolisina²¹⁰ (izquierda), los octafenilenos de Matile²¹¹ (centro) o los macrociclopéptidos híbridos²¹² (derecha).

La mayor parte de los esfuerzos sintéticos en este campo se han dedicado a la preparación de nanotubos lipídicos (Figura 23, derecha),²¹⁴ los cuales presentan características muy interesantes puesto que la modificación del monómero anfipático que los compone permite tanto la modificación del interior (generalmente hidrofílico) como la del exterior (hidrofóbico) de la cavidad. Además, con esta estrategia es posible llegar a generar nanoestructuras de hasta 200 nm, dimensiones a las que no es fácil llegar con otras aproximaciones, las cuales son fácilmente manipulables mediante diversas técnicas como la microfluídica. Recientemente, también se han descrito otras metodologías que utilizan sustratos inorgánicos para la preparación de estas estructuras autoensambladas.²¹⁵

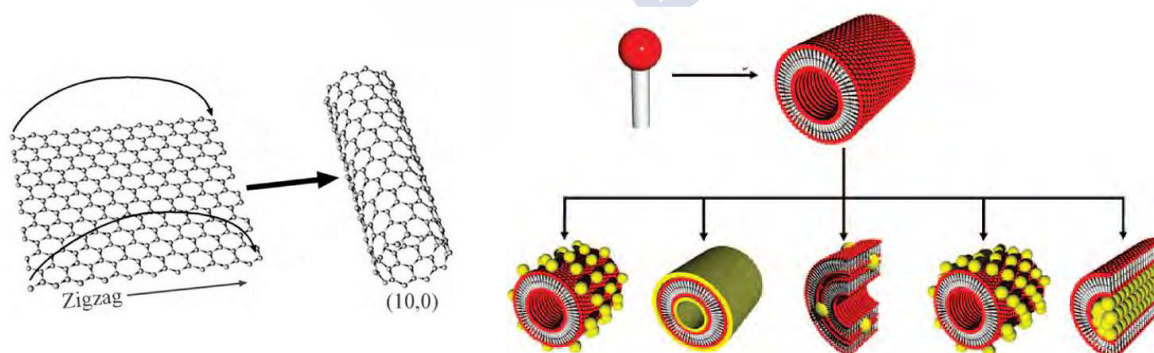


Figura 23. Estructuras formadas por el plegamiento de láminas bidimensionales como los nanotubos de carbono (izquierda) o los nanotubos lipídicos (derecha), donde se muestra la versatilidad que presentan para modificar tanto sus propiedades externas como internas.²¹⁴

²¹³ A. K. Geim, K. S. Novoselov, *Nat. Mater.* **2007**, 6, 183-191.

²¹⁴ Y. Zhou, T. Shimizu, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 625-633.

²¹⁵ Z. Lai, Y. Chen, C. Tan, X. Zhang, H. Zhang, *Chem.* **2016**, 1, 59-77.

Continuando con la búsqueda de nuevas estrategias que permitan la obtención de nanotubos huecos, se encontró que es posible diseñar moléculas con forma de cuña que se ensamblen en forma de discos, rosetas o hélices, las cuales son las que determinan en última instancia la estructura 1D hueca. Esta aproximación se inspira en procesos naturales tremendamente complejos, como por ejemplo en el autoensamblaje de la cápside del virus del mosaico del tabaco.²⁹

Es habitual que para lograr este tipo de interacciones a nivel sintético se usen moléculas que presentan una curvatura o forma de cuña intrínseca, como los lípidos o los dendrímeros.²¹⁶ Además, otros sistemas más simples basados en dipéptidos²¹⁷ o bisureas²¹⁸ o, *a priori*, más complejos basados en cavitandos como los calixarenos,²¹⁹ también han sido extremadamente eficientes en este campo.

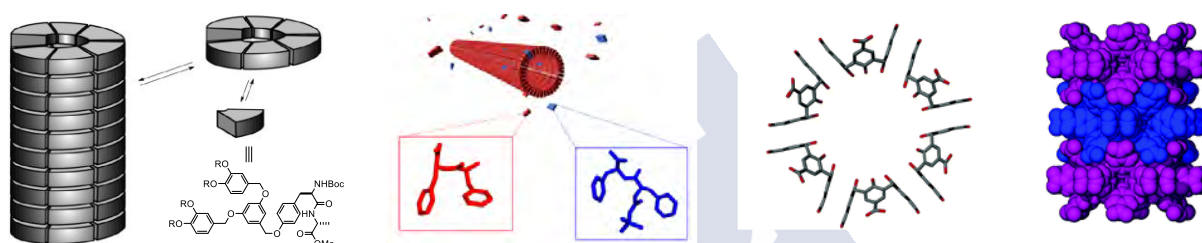


Figura 24. Asociación de moléculas sectoriales dendríticas²¹⁶ (izquierda), dipeptídicas²¹⁷ (centro), o calix[4]arénicas²¹⁹ (derecha) para dar lugar a nanotubos huecos.

La última aproximación que comentaremos para la preparación de nanotubos huecos consiste en el apilamiento de moléculas cíclicas planas, la cual, a pesar de no contar con ejemplos en el campo de la biología, presenta una serie de ventajas que la hacen ser una de las más interesantes. Para empezar, el diámetro, tanto interno como externo, del nanotubo está exclusivamente determinado por el diámetro la molécula cíclica que se apila, lo que hace más fácil el diseño de nanotubos con dimensiones a la carta. Además, si los anillos cuentan con una relativa rigidez, es sencillo controlar las propiedades internas y externas del nanotubo mediante la correcta disposición de grupos funcionales en las partes del monómero que quedan hacia uno u otro lado. Alguno de los macrociclos planos que más se han utilizado en esta área son las ureas,²²⁰ los compuestos poliaromáticos basados en el π - π *stacking*,²²¹ o los péptidos cíclicos,²²² sobre los que profundizaremos a continuación.

²¹⁶ H.-J. Sun, S. Zhang, V. Percec, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3900-3923.

²¹⁷ I. W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6866-6881.

²¹⁸ B. Isare, M. Linares, L. Zargarian, S. Femandjian, M. Miura, S. Motohashi, N. Vanthuyne, R. Lazzaroni, L. Bouteiller, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 173-178.

²¹⁹ S. S. Kennedy, S. J. Dalgarno, *Chem. Commun.* **2009**, 5275-5277. G. W. Orr, L. J. Barbour, J. L. Atwood, *Science* **1999**, *285*, 1049-1052.

²²⁰ V. Semetey, C. Didierjean, J.-P. Briand, A. Aubry, G. Guichard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1895-1898.

²²¹ K. Ono, K. Tsukamoto, R. Hosokawa, M. Kato, M. Suganuma, M. Tomura, K. Sako, K. Taga, K. Saito, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 122-125.

²²² N. Rodríguez-Vázquez, M. Amorín, J. R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4490-4505.

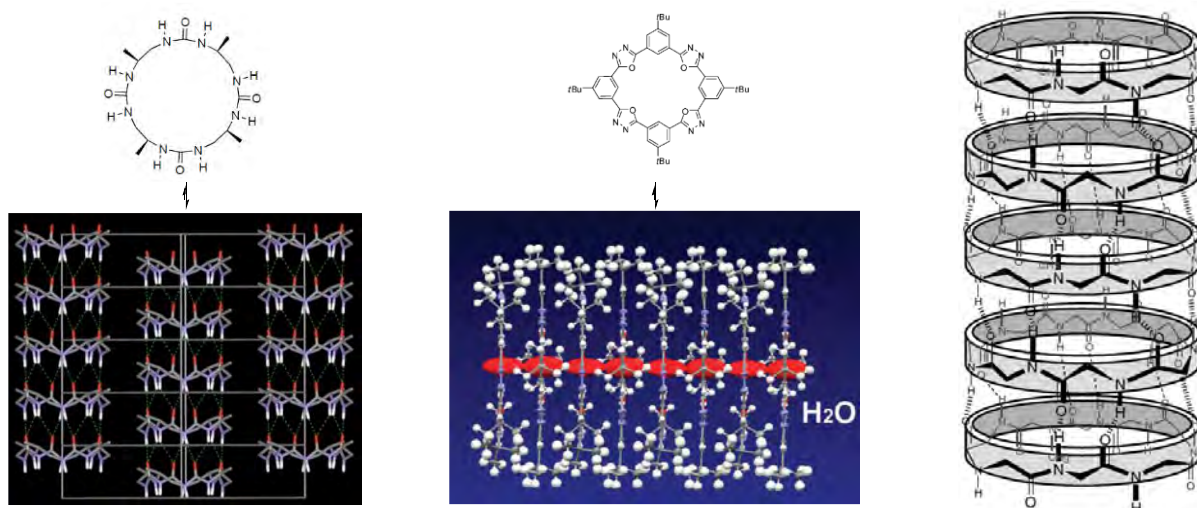


Figura 25. Estructuras tubulares basadas en el apilamiento de moléculas cíclicas. De izquierda a derecha: ureas cíclicas,²²⁰ compuestos poliaromáticos²²¹ o péptidos cíclicos.²²²

El autoensamblaje de ciclopeptidos se basa en el apilamiento de varias unidades de estas moléculas a través de la formación de un entramado de enlaces de hidrógeno, el cual mantiene a los macrociclos adyacentes unidos. Para lograr este objetivo, el diseño se fundamenta en la utilización de macrociclos con un número par de átomos en donde la conformación plana viene determinada por la correcta elección de la quiralidad y las características de los aminoácidos empleados. De esta manera, en dicha conformación, las cadenas laterales de los Aa se disponen en una conformación pseudo-ecuatorial que apunta de manera radial hacia el exterior del nanotubo, mientras que los grupos amida quedan en una disposición vertical perpendicular al plano del anillo que favorece la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos dadores (NH) de un péptido y los aceptores (carbonilo) del contiguo. Usando esta estrategia se han diseñado multitud de sistemas ciclopeptídicos diferentes basados en un único tipo de aminoácidos o que combinan dos (o más) familias de aminoácidos (naturales o sintéticos) diferentes. A continuación, describiremos en detalle los ejemplos más representativos.

1.3.1. Nanotubos y dímeros constituidos por α -CPs

Los α aminoácidos (α -Aas) fueron los primeros monómeros en los que los químicos se centraron para la preparación de CPs autoensamblantes, debido a su gran disponibilidad y el conocimiento que se tenía sobre los sistemas peptídicos naturales que utilizan dichos aminoácidos. El estudio original en este campo data del año 1974, cuando De Santis postuló, mediante estudios teóricos, que se podrían utilizar ciclopeptidos constituidos por un número par de α -Aas de quiralidad alternante (de ahora en adelante D,L - α -CPs) como precursores de nanotubos.²²³ Esta capacidad residía en la posibilidad de que adquiriesen una conformación plana que dispusiera las amidas con una orientación propicia para la formación de interacciones análogas a las observadas en las láminas β naturales. Tras esta publicación se llevaron a cabo

²²³ P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, *Macromolecules* **1974**, 7, 52-58.

varias aproximaciones experimentales en los años siguientes, aunque con poco éxito a la hora de demostrar el apilamiento de estos precursores debido, fundamentalmente, a la escasa solubilidad de los CPs estudiados.²²⁴ No fue hasta prácticamente 20 años después del primer trabajo de De Santis cuando, en el grupo de Ghadiri se consiguieron evidencias sólidas sobre la formación de estructuras tubulares a partir de *D,L*- α -CPs.²²⁵ Concretamente, la clave de su éxito consistió en la utilización del *c*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)₂] a partir del cual fue posible obtener agregados microcristalinos, partiendo de una disolución acuosa básica, en la que el péptido es perfectamente soluble, por la desprotonación total de su residuo de ácido glutámico. De esta forma, al ir reduciendo progresivamente el pH del medio se daba lugar a agujas de gran longitud (10-30 μ m) y un diámetro de 100-500 nm. La caracterización de estos tubos mediante técnicas espectroscópicas y de microscopía permitió establecer que los nanotubos estaban constituidos por unidades cíclicas apiladas, presentando una distancia vertical entre cada subunidad de 4.7 Å y una separación lateral entre nanotubos de 14.9 Å. Cada nanotubo individual presentaba un diámetro interno de entre 7 y 8 Å (Figura 26). Estudios de FTIR demostraron que el ensamblaje se basaba en la formación de láminas β antiparalelas.

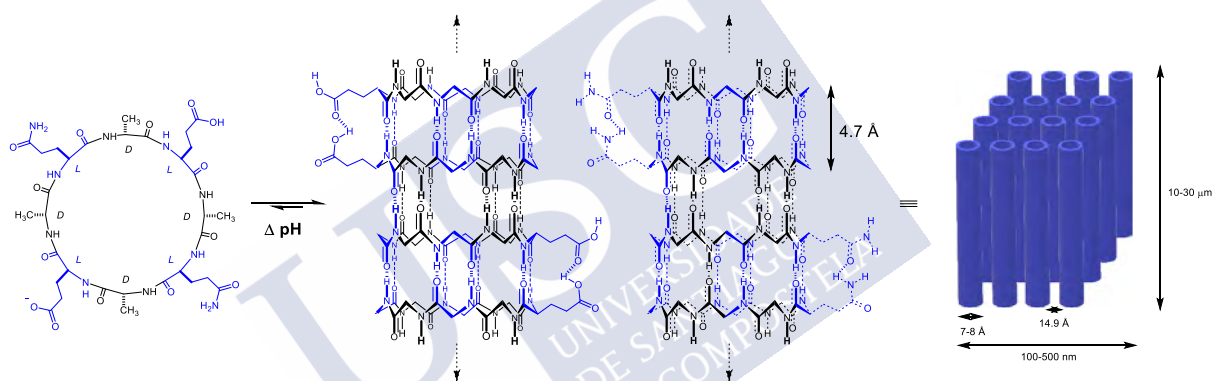


Figura 26. Estrategia seguida por el grupo de Ghadiri para preparar los primeros nanotubos peptídicos. Algunas cadenas laterales se han omitido en la representación tridimensional por claridad.²²⁵

Tras este primer ejemplo, se profundizó en el estudio de estructuras similares a estas pero de un tamaño de cavidad mayor, utilizando en su secuencia una unidad adicional del tetrapéptido basado en Gln y Glu que había sido empleado en el ejemplo previo.²²⁶ Adicionalmente, se modificaron también el tipo de aminoácidos hidrofóbicos (cambiando Ala por Leu, Phe o Val) con el objetivo de poner de manifiesto la modulabilidad de las propiedades externas del nanotubo,²²⁷ lo que incluso ha permitido obtener nanotubos en otros disolventes, como el acetonitrilo, combinando residuos básicos y apolares.²²⁸ Cabe destacar que también ha sido posible obtener nanotubos a partir de dos CPs enantioméricos explotando el recurso del impedimento estérico de sus cadenas laterales, lo que favorece un autoensamblaje basado en el

²²⁴ L. Tomasic, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1012-1016.

²²⁵ M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324-327.

²²⁶ N. Khazanovich, J. R. Granja, D. E. McRee, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6011-6012.

²²⁷ J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 43-50.

²²⁸ R. Hourani, C. Zhang, R. van der Weegen, L. Ruiz, C. Li, S. Ketten, B. A. Helms, T. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15296-15299.

apilamiento heteromérico de ambos componentes de manera exclusiva, donde ambos enantiómeros se intercalan en el nanotubo.²²⁹ En muchos de estos ejemplos, los agregados supramoleculares obtenidos no presentaban un tamaño suficiente como para resolver la estructura de estas interesantes arquitecturas átomo a átomo. Este problema podría ser debido a la capacidad del nanotubo de crecer de manera (idealmente) infinita, lo que, además, limita en gran medida sus aplicaciones una vez se lleva a cabo el proceso de autoensamblaje. No ha sido hasta hace muy pocos años cuando se ha logrado resolver la estructura cristalina, tanto con una estructura de lámina β paralela como antiparalela, de este tipo de nanotubos peptídicos autoensamblados.²³⁰

Con el objetivo de determinar la estructura a nivel atómico de estos sistemas supramoleculares, así como de estudiar en detalle las propiedades termodinámicas del proceso de autoensamblaje, Ghadiri y colaboradores decidieron poner coto al crecimiento indefinido de los nanotubos peptídicos y se centraron en el desarrollo de sistemas en los que se pudiese estudiar las interacciones mínimas que provocan el apilamiento, a saber, sistemas diméricos. Para ello, los autores exploraron una característica intrínseca de los *D,L*- α -CPs por la cual todos los residuos homocirales presentan sus grupos NH y C=O hacia la misma cara, por lo que, si se impide la formación de enlace de hidrógeno por una de esas caras se bloquea el crecimiento del nanotubo, puesto que solo puede producirse el apilamiento por la cara opuesta y desemboca en la formación del nanotubo más corto posible, un dímero. Este bloqueo se llevó a cabo mediante la sustitución de los protones amídicos de la alanina en la secuencia *c*-[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ala)₄] por grupos metilo (Figura 27).²³¹ A pesar de que este no fue el primer estudio sobre *D,L*- α -CPs *N*-metilados (Lorenzi había estudiado previamente un ciclohexapéptido basado en el mismo dipéptido)²³², se trata del primero en el cual se estudia de manera detallada el proceso de dimerización, atendiendo a sus parámetros termodinámicos. Los estudios por RMN demostraron la existencia de dos especies en disolución, que se atribuyeron a la forma monomérica en equilibrio con la dimérica, donde los cambios más significativos aparecían en el desplazamiento químico de los NHs, que se desapantallaban fuertemente en la forma dimérica, lo que corroboraba la formación de la especie ensamblada al justificarse este cambio en el desplazamiento por su implicación en la formación de enlaces de hidrógeno. Las constantes de asociación calculadas, así como los desplazamientos químicos, eran variables en función del disolvente en el que se llevasen a cabo los experimentos, aunque rondaban valores de 10^3 - 10^4 . La difracción de rayos X permitió la resolución estructural detallada del dímero, en la que se corroboraban los datos obtenidos mediante microcristales previamente, con distancias N-O intermoleculares de 2.90 Å y con un diámetro (Van der Waals) interno de 7.5 Å.

Profundizando en esta idea, se realizaron estudios de RMN con la mezcla de enantiómeros del ciclooctapéptido previamente caracterizado, que sirvieron para calcular la estabilidad relativa de los dímeros ensamblados mediante una lámina β paralela (heterodímero) o antiparalela (homodímeros). El RMN de protón en cloroformo de la mezcla racémica mostraba señales para cada una de las posibles especies diméricas presentes en disolución y, mediante el cálculo del área relativa, llegaron a la conclusión de que la lámina β antiparalela era más estable (0.8 kcal/mol) que la lámina β paralela.²³¹ Estudios de dimerización posteriores con la mezcla

²²⁹ K. Rosenthal-Aizman, G. Scensson, A. Undén, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3372-3373.

²³⁰ M. Silk, J. Newman, J. Ratcliffe, J. White, T. Caradoc-Davies, J. R. Price, S. Perrier, P. E. Thompson, D. K. Chalmers, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6613-6616.

²³¹ M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93-95.

²³² X. C. Sun, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1520-1526.

racémica de otros CPs con composición aminoacídica diferente arrojaron resultados similares, por lo que se descartó que la diferencia de estabilidad de ambas especies estuviese provocada por interacciones entre las cadenas laterales de ambos ciclos.²³³ Finalmente, se realizó un estudio en profundidad de otros ciclos que presentaban diferentes tamaños y diferentes grupos alquilo bloqueando la formación de enlace de hidrógeno. Estas extensas investigaciones demostraron que no todos los sistemas eran capaces de dar lugar a dímeros estables y que la elección de las cadenas alquílicas no era trivial, puesto que podrían llegar a darse interacciones estéricas desfavorables al incorporar cadenas largas sobre el esqueleto peptídico.²³⁴

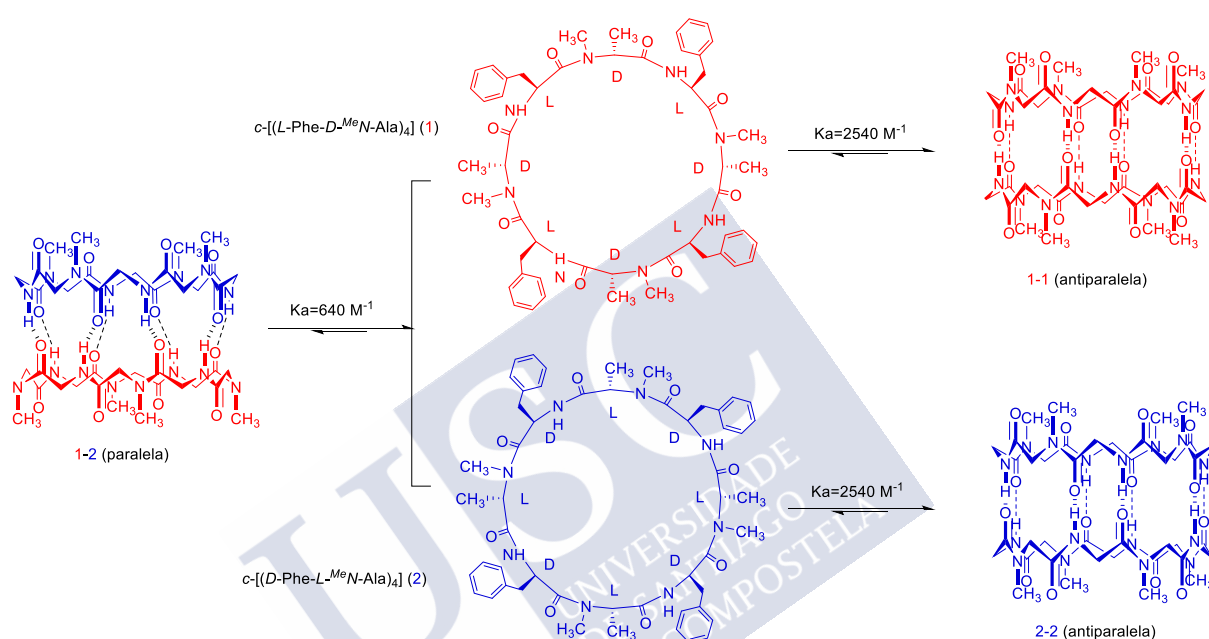


Figura 27. Proceso de dimerización de la mezcla racémica del D,L - α -CP $c-[(L/D\text{-Phe-}D/L\text{-}^{\text{Me}}N\text{-Ala})_4]$.

1.3.2. Nanotubos y dímeros constituidos por α,γ -CPs

A medida que se iban conociendo las propiedades de autoensamblaje de los D,L - α -CPs y se descubrían todas las posibilidades que ofrecían estas plataformas nanotecnológicas, quedaba patente que estas estructuras no eran buenas candidatas a la hora de intentar modular las condiciones internas del nanotubo que estas determinan, ya que ninguno de los protones de la posición α apunta directamente a la cavidad y por tanto su sustitución por otros grupos no es susceptible de producir modificaciones relevantes en ella. El mismo fenómeno se observaba con los nanotubos formados por β -CPs (ver Sección 1.3.3), donde la orientación de los protones metilénicos tampoco parecía propicia para poder modificar el interior. Para solucionar este problema, en nuestro grupo de investigación se desarrolló una nueva familia de péptidos cíclicos, denominados α,γ -CPs, que combinaba un número idéntico de residuos de α -Aas

²³³ K. Kobayashi, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 95-98.

²³⁴ T. D. Clark, J. M. Buriak, K. Kobayashi, M. P. Isler, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8949-8962.

naturales con γ -Aas cíclicos artificiales (γ -Acas) con un patrón de sustitución *cis*.²³⁵ Estos nuevos γ -Acas guardaban cierta equivalencia con su parientes α , ya que es preciso escoger la combinación de quiralidades precisas entre ambos residuos para que se pueda producir la planarización y posterior apilamiento. Para su diseño se puede considerar la sustitución de todos los residuos homocirales de un D,L - α -CPs por su γ -Aca de quiralidad equivalente. Esta equivalencia se detalla en la parte inferior de la Figura 28, donde se muestra la analogía existente entre los diferentes residuos y la convención utilizada a la hora de nombrarlos.

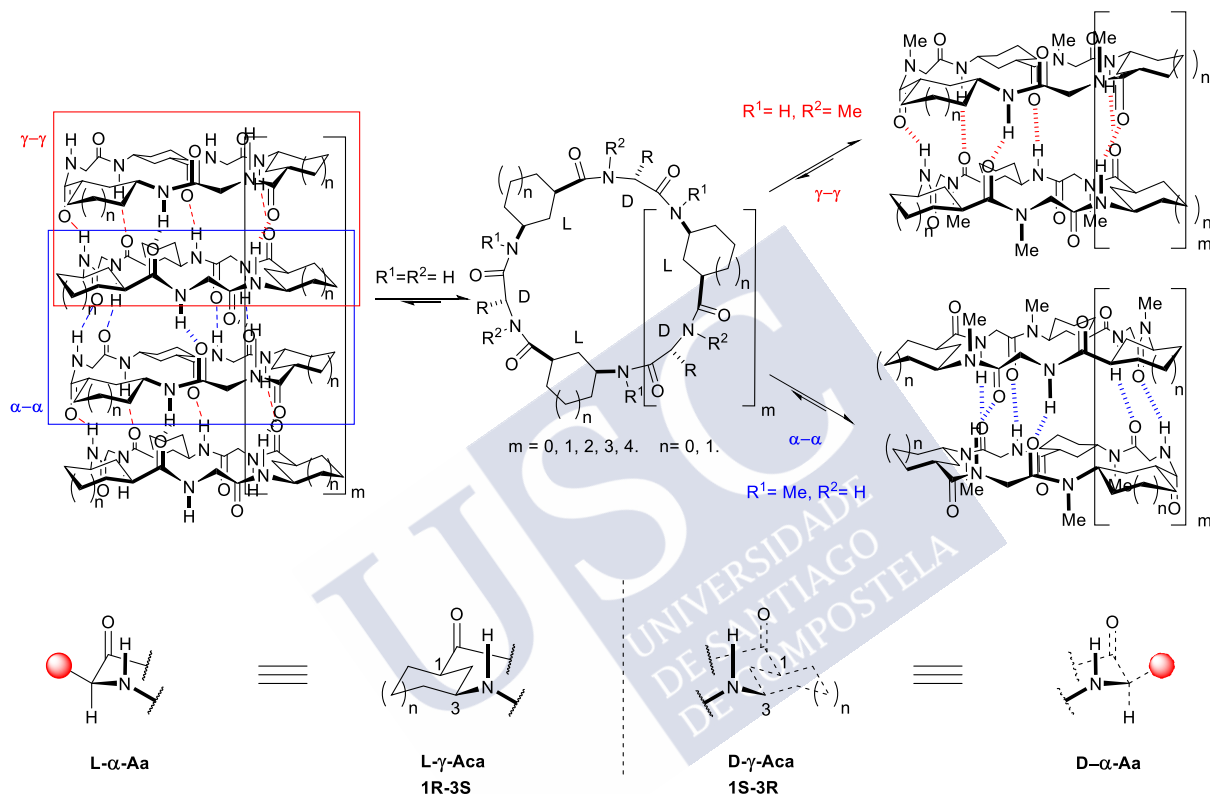


Figura 28. Estructura de los α,γ -CPs, donde se muestran las diferentes interacciones entre residuos homocirales que determinan la aparición de dos tipos de enlace de hidrógeno durante su proceso de apilamiento (arriba). Abajo: Equivalencia existente entre la quiralidad de los α -Aas y los ácidos 3-aminocicloalcanocarboxílicos (γ -Acas).²³⁵

Al contar con un número impar de átomos, los grupos carbonilo y NH de cada tipo de Aa quedan nuevamente orientados hacia la misma cara, lo que en esta ocasión supone que todas las amidas de los γ -Acas queden orientadas hacia la denominada cara γ , mientras que todos los α -Aas exponen sus aceptores y dadores de enlace de hidrógeno hacia la cara contraria (cara α). Además, la diferente separación entre los grupos aceptores/dadores de enlace de hidrógeno de los aminoácidos supone que, por motivos geométricos, solo se puede producir una interacción productiva de apilamiento entre residuos de la misma familia (α con α en azul y γ con γ en rojo, Figura 28) para dar lugar a una lámina β antiparalela, lo que supone un nuevo condicionante a

²³⁵ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

la hora de diseñar estructuras funcionales, como veremos más adelante. Además, la presencia del anillo cicloalcánico en la secuencia ciclopeptídica dota a estos macrociclos de una rigidez adicional frente a sus análogos compuestos únicamente por α -Aas. Esto se traduce en una ventaja importante a la hora de construir macrociclos de mayor tamaño (mayor número de aminoácidos en su secuencia), ya que esta rigidez limita en cierta medida el plegamiento de la estructura, que impediría la planarización requerida para el ensamblaje supramolecular.

Dada la clara diferenciación entre las dos caras de los α,γ -CPs, ha sido posible estudiar a nivel termodinámico el proceso de dimerización a través de ambas caras de manera independiente. Para esta tarea, en primer lugar, se estudiaron sistemas de ciclohexapéptidos que combinaban el γ -Aca que posee un anillo de 6 miembros (ácido (1*R*,3*S*)-aminociclohexano carboxílico, *L*- γ -Ach, *n*=1 en la Figura 28) con el enantiómero opuesto de la Phe. La *N*-metilación selectiva de un tipo u otro de residuos condujo a la obtención de las K_a derivadas de los dos tipos de interacciones. De este modo, la interacción γ - γ , estudiada en CHCl₃ mediante el uso de *c*-[(*D*-^{Me}*N*-Ala-*L*-Ach)₃], resultó ser mucho más débil (K_a en torno a 10² M⁻¹) que su análoga α - α (*c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)₃]), que presenta un valor de K_a del orden de 10⁵ M⁻¹. Además, la resolución de la estructura cristalográfica de este último CP permitió observar la presencia de una molécula de CHCl₃ en la cavidad, evidenciando la mayor hidrofobicidad de este tipo de cavidades en comparación con los *D,L*- α -CPs. No obstante, trabajos posteriores han encontrado moléculas de agua desordenadas en el interior del dímero, lo que demuestra un cierto comportamiento anfifílico.²³⁶

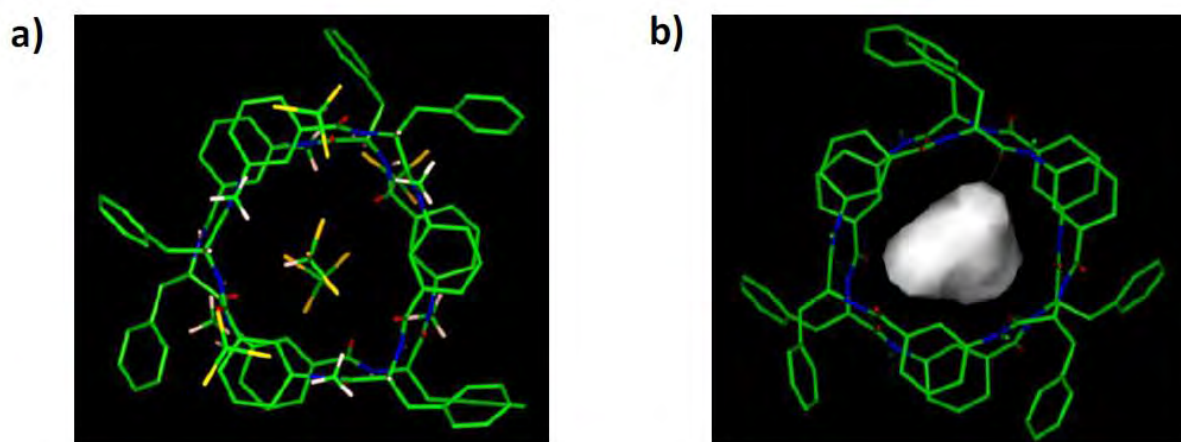


Figura 29. Estructura cristalográfica del *c*-[(*D*-Phe-*L*-^{Me}*N*-Ach)₃] en su forma dimérica que muestra una molécula de cloroformo en su cavidad (a) y la posición promediada de 4 moléculas de agua desordenadas en la cavidad (b).²³⁶

En cuanto a ciclos más pequeños como los ciclotetrapéptidos, no fue posible apreciar interacción γ - γ , mientras que la K_a α - α se situaba en torno a 10² M⁻¹.²³⁷ La tendencia de que la

²³⁶ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* **2005**, 15, 87-92.

²³⁷ M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684. M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Heterocycles* **2006**, 67, 575-583.

interacción α - α era más fuerte que la γ - γ se evidenció también para ciclos de mayor tamaño,²³⁸ lo que quizás se justifique en base al mayor impedimento estérico presente entre el grupo *N*-Me y el carbonilo en los residuos α , lo que puede llegar a desestabilizar la conformación plana penalizando el proceso de formación del dímero.²³⁹

Expandiendo esta metodología, se utilizó también el ácido 3-aminociclopentano carboxílico (γ -Acp, $n=0$ en la Figura 28), que presenta un ángulo mayor entre C=O y NH que su análogo Ach (140 frente a 120°), lo que permite la obtención de ciclos de mayor tamaño.²⁴⁰ En esta línea, este monómero se ha empleado para la preparación de una amplísima biblioteca ciclopeptídica que abarca desde tetrapéptidos hasta hexadecapéptidos.²⁴¹ El análisis del proceso de dimerización mostró que, salvo en el caso de los ciclotetrapéptidos ($K_a \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$), las interacciones mediante la cara α mostraba valores de $K_a > 10^5$, mientras que, si se invertía el patrón de *N*-metilación, la interacción mediante la cara γ únicamente daba lugar a estructuras plegadas en los que los enlaces de hidrógeno intramoleculares impedían la conformación plana, quizás inducido por la mayor flexibilidad del anillo de 5 miembros. En nuestro grupo de investigación también se ha propuesto la utilización de la versión insaturada del Acp, concretamente el ácido 4-aminociclopent-2-enocarboxílico (γ -Ace) como unidad constituyente de α,γ -CPs, ya que este presenta un ángulo todavía mayor en el plano determinado por C=O- C_α y NH- C_γ . No obstante, la presencia de la insaturación en el anillo del γ -Aa provocaba una tendencia a la epimerización del C_α muy superior a la de los demás análogos saturados, lo que hacía de la síntesis peptídica un proceso tedioso y poco eficiente. Además, los dímeros formados por este γ -Aa mostraron valores de K_a muy bajos, lo que propició el abandono de su uso.²⁴⁰

Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de dimerización en presencia de mezclas de α,γ -CPs compuestos por un número idéntico de aminoácidos pero variando el tipo de γ -Aa en su esqueleto. De esta manera, la mezcla equimolar de un péptido cíclico compuesto por Acp y otro compuesto por Ach (ambos residuos de la misma quiralidad) dio lugar de manera preferente a la especie heterodimérica sobre las especies homodiméricas (Figura 30).^{241b} Este proceso demostró ser independiente del tipo de α -Aas empleados, por lo que se concluye que se trata de una interacción guiada por el esqueleto peptídico y no por hipotéticas interacciones entre las cadenas laterales. Este sistema de diversificación estructural, que también es ampliamente utilizado por los sistemas naturales,²⁴² ha permitido la obtención selectiva de sistemas funcionales muy interesantes, como veremos más adelante en la Sección 1.3.4 y en el desarrollo de la discusión de esta memoria.

²³⁸ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.

²³⁹ R. García-Fandiño, L. Castedo, J. R. Granja, S. A. Vázquez, *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 4973-4983.

²⁴⁰ C. Reiriz, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 241-249.

²⁴¹ a) Ciclotetrapéptidos: Ref. 237. b) Ciclohexapéptidos: R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713. c) Ciclooctapéptidos: R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267-3269. R. J. Brea, M. J. Pérez-Alvite, M. Panciera, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 110-121. d) Ciclododecapéptidos y ciclododecapéptidos: R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267-3269. e) Ciclohexadecapéptidos: R. J. Brea, *Diseño, síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ -ciclopeptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (**2013**).

²⁴² P. M. Bowers, S. J. Cokus, D. Eisenberg, T. O. Yeates, *Science* **2004**, *306*, 2246-2249.

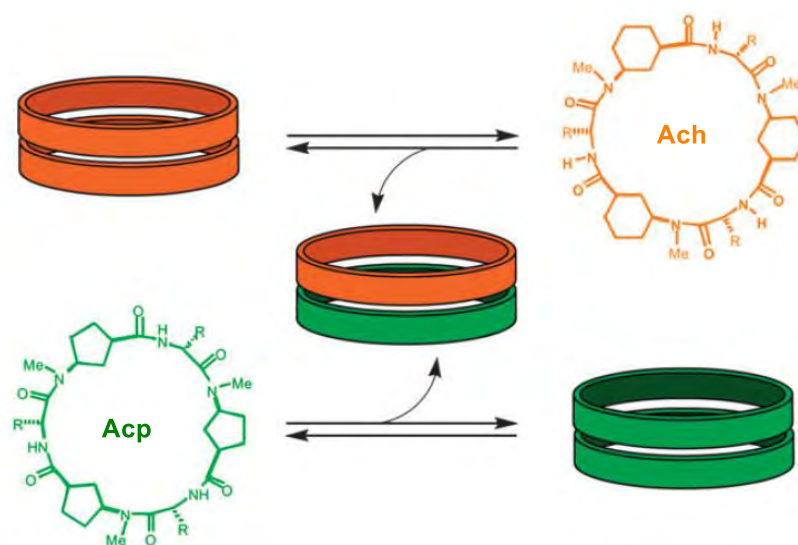


Figura 30. Esquema de formación de dímeros de naturaleza heterodimérica frente a sus análogos homodiméricos.^{241b}

Como se ha dicho con anterioridad, una de las principales ventajas que ofrece la incorporación de γ -Acas en la estructura ciclopeptídica es la presencia de una posición metilénica (C_β) orientada directamente hacia la cavidad, por lo que en los últimos años se han llevado a cabo importantes avances en el desarrollo de CPs modificados en esa posición de tal manera que posicionen grupos funcionales apropiados hacia la cavidad del anillo. El primer ejemplo de estas características se describió en el año 2009, donde se incluyó en la secuencia de un α,γ -ciclotetrapéptido un residuo de ácido 4-amino-3-hidroxitetrahydrofuran-2-carboxílico (γ -Ahf), preparado a partir de la *D*-xilosa (Figura 31) que presenta un grupo hidroxilo proyectado hacia la cavidad dimérica. Estudios de dimerización sobre *c*-[*D*-Ala- γ -Ahf-*D*-Tyr(Me)-Acp] demostraron que si el grupo hidroxilo estaba protegido (OBn), el péptido no dimerizaba, mientras que al desprotegerse, la constante de dimerización aumentaba más de dos órdenes de magnitud frente a otros ciclotetrapéptidos compuestos únicamente por Ach, lo que evidencia la implicación de este grupo hidroxilo en el proceso de autoensamblaje.²⁴³

Con la idea de explotar las propiedades que ofrece este grupo hidroxilo, recientemente se ha publicado la incorporación de este Aa β -hidroxilado en las secuencias octapeptídicas *c*-[(*D*-Leu- γ -Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Acp)₂] y *c*-[(*D*-Leu-^{Me}N- γ -Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}N-Acp)₂]. La primera de estas estructuras no fue capaz de adquirir la conformación plana debido a un plegamiento intramolecular, que propició el descubrimiento de un agregado hexamérico de geometría esférica con capacidad para reconocer aniones y transportar iones carbonato y nitrato a través de membranas lipídicas (Figura 31, parte superior).²⁴⁴ Sin embargo, cuando el residuo de Ahf se *N*-metilaba (segunda secuencia), tampoco se lograba la planarización esperada con los hidroxilos orientados hacia el interior de la cavidad, imposibilitando la caracterización de especies diméricas. Sin embargo, la adición de pequeñas cantidades de MeOH o agua (5%) sí dio lugar a estructuras diméricas, lo que sugiere que la cavidad hidrofílica requiere la presencia

²⁴³ C. Reiriz, M. Amorín, R. García-Fandiño, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4358-4361.

²⁴⁴ N. Rodríguez-Vázquez, M. Amorín, I. Alfonso, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4504-4508.

de moléculas polares. Además de dejar el grupo hidroxilo “desnudo” en el interior, es posible modificar esta posición con otros grupos para modificar las propiedades de la cavidad, aunque reduciendo notablemente su diámetro. En esta línea, se ha hecho reaccionar este ciclo con dos unidades de ácido picolínico, lo que ha permitido la encapsulación de iones de plata o ácidos dicarboxílicos (como el ácido oxálico) en la cavidad (Figura 31, parte inferior).²⁴⁵ Estos ejemplos han propiciado el desarrollo de agentes citotóxicos basados en el ciclodecapéptido *c*-[*L*-^{Me}N-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Ala-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Ach-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Prg-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Ala], en el que la presencia de un grupo carboxilato apuntando hacia la cavidad permitió su complejación a complejos derivados de *cis*-platino que mostraron actividad contra varias líneas celulares cancerosas.²⁴⁶

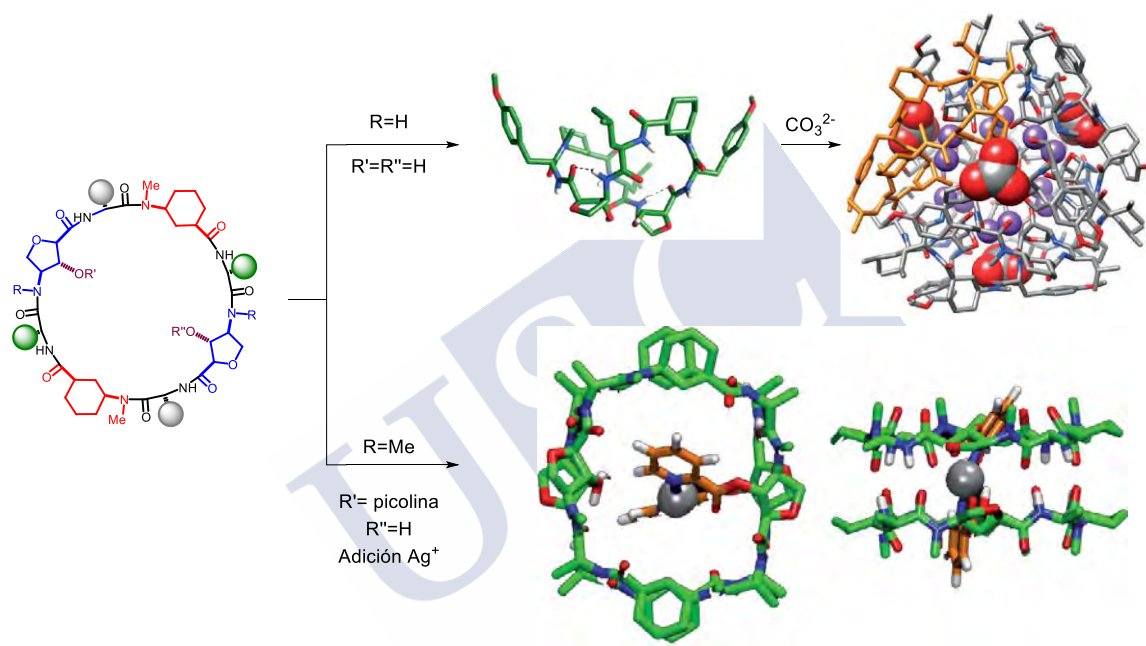


Figura 31. Diferentes patrones de *N*-metilación determinan la estructura secundaria de CPs que contienen dos residuos del Aa sintético γ -Ahf (en azul).^{244,245}

Utilizando una aproximación ligeramente diferente, aunque también empleando un azúcar como sustrato, se preparó un γ -Aa derivado del ácido glucurónico que se denominó γ -Aga (Figura 32, azul), el cual se incorporó en la secuencia de un ciclooctapéptido compuesto únicamente por γ -Aas. La particularidad de este Aa es que incorpora un átomo de oxígeno hemiaminámico en la posición β , el cual apunta al interior de la cavidad. A pesar de que las aplicaciones de este CP no se han estudiado más allá de su caracterización estructural, se observó que, dada la simetría *C*₂ de este macrociclo, se formaba preferentemente el dímero alternado, en el que los residuos de γ -Aga no se situaban uno encima del otro, seguramente debido a la repulsión electrónica del par solitario del oxígeno β .²⁴⁷ Adicionalmente, en nuestro

²⁴⁵ N. Rodríguez Vázquez, R. García Fandiño, M. Amorín, J. R. Granja, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 183-187.

²⁴⁶ N. Rodríguez-Vázquez, R. García-Fandiño, M. J. Aldegunde, J. Brea, M. I. Loza, M. Amorín, J. R. Granja, *Org. Lett.* **2017**, 19, 2560-2563.

²⁴⁷ A. Guerra, R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 8762-8766.

grupo de investigación se han preparado otros aminoácidos con anillos de 5 y 6 miembros funcionalizados en la posición β con grupos metilo, flúor o hidroxilo, pero no se han empleado en la preparación de CPs debido a la dificultad que presentan para su obtención en gran escala y en forma enantioméricamente pura (Figura 32, derecha).²⁴⁸ Otros grupos de investigación han aportado su contribución a esta línea de investigación utilizando otras alternativas sintéticamente más eficientes. Así, el grupo de Ting Xu sustituyó uno de los α -aminoácidos de un *D,L*- α -ciclooctapéptido por un residuo del ácido 3-amino-2-metilbenzoico. Con esta aproximación se observó que el metilo de la posición C2 aromática está orientado hacia el interior de la cavidad, lo que le aporta una mayor hidrofobicidad a costa de reducir notablemente el diámetro interno del ciclo (Van der Waals) que pasa de 7.6 a 4.7 Å. Además, la incorporación de este Aa aromático distorsiona notablemente la conformación plana, demostrando que esta aproximación dista mucho de ser óptima a pesar de su mayor simplicidad sintética.²⁴⁹

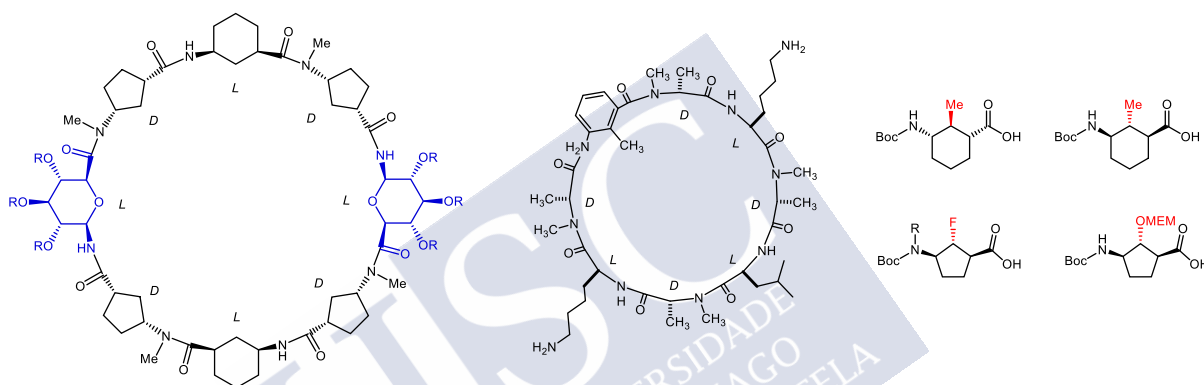


Figura 32. Izquierda: CP que incluye residuos del aminoácido sintético γ -Aga.²⁴⁷ Centro: CP descrito por Xu basado en un *D,L*- α -ciclooctapéptido que sustituye un residuo por una unidad del ácido 3-amino-2-metilbenzoico, que proyecta un metilo hacia la cavidad.²⁴⁹ Derecha: Aminoácidos sintéticos desarrollados en nuestro grupo de investigación con diferentes grupos funcionales (rojo) anclados al carbono β .²⁴⁸

1.3.3. Sistemas constituidos por otros CPs

Además de los sistemas descritos hasta este punto basados en *D,L*- α -CPs y α,γ -CPs, en las últimas dos décadas se han desarrollado muchos más ejemplos compuestos por otras familias de aminoácidos, ya sea usando un solo tipo de Aas o la mezcla de varias clases. Sin ir más lejos, en la sección anterior se ha introducido un ciclo basado en únicamente γ -Aas cuando se discutía sobre la funcionalización de la posición β . El grupo de Deng también ha publicado un ejemplo de CPs contruidos exclusivamente a partir de γ , concretamente mediante residuos de Ach modificados en la posición 5 con cadenas polioxigenadas, lo que le confiere mayor hidrofilia en la parte externa al ciclo. Además, hay que destacar que para los α,γ -CPs, la

²⁴⁸ N. Rodríguez-Vázquez, S. Salzinger, L. F. Silva, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3477-3493.

²⁴⁹ R. Hourami, C. Zhang, R. Van der Weeger, C. Ruiz, C. Li, S. Keten, B. A. Helms, T. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15296-15299.

alternancia entre ambos tipos de monómeros no está restringida a la relación 1:1. De hecho, dada la equivalencia comentada previamente entre la quiralidad de ambos residuos, ha sido posible desarrollar ejemplos en los que solo uno de cada cuatro residuos sean de tipo γ , conocidos generalmente como $3\alpha,\gamma$ -CPs. Estos diseños, al dimerizar, adquieren unas formas que se asemejan más a elipses que a circunferencias, dadas las diferencias en la apertura del ángulo entre α y γ Aas. Además, existen diferencias notables en el valor de K_a del proceso de dimerización en función del patrón de *N*-metilación del esqueleto peptídico e incluso se puede llegar a producir la formación de hélices supramoleculares.²⁵⁰

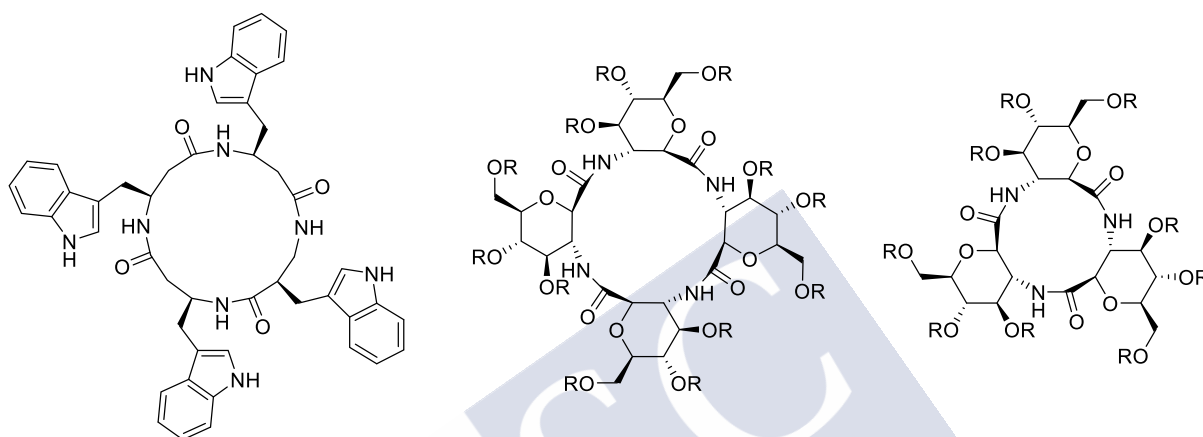


Figura 33. Estructuras de β -CPs sintetizados por Seebach²⁵¹ (izquierda) y Kimura²⁵² (centro y derecha).

Cronológicamente, los primeros CPs en aparecer fueron los compuestos por únicamente β -Aas. En el grupo de Seebach utilizaron cuatro residuos de β^3 -HAla para obtener un CP capaz de dimerizar. No obstante, dado el número par de átomos que separan ambos grupos formadores de enlace de hidrógeno, estos CPs planarizaban presentando todos los grupos NH hacia la misma cara y todos los grupos carbonilo hacia la opuesta, formando dímeros mediante el establecimiento de láminas β paralelas. Este fenómeno implica que el nanotubo formado presente una anisotropía neta, no observada en otros sistemas ciclopeptídicos. Se pudo comprobar que si se utilizaban β -Aas monosustituídos en el carbono β , la quiralidad que estos presentasen no tenía un papel relevante a la hora de adquirir la conformación plana requerida para dimerizar.²⁵¹ También se han utilizado β -Aas cíclicos con anillos de 5 y 6 miembros derivados de azúcares los cuales, además de aportar una mayor rigidez al sistema, modificaban notablemente las propiedades externas del nanotubo. Además, aparte de dotarlos de una mayor hidrofilia, permitían su interacción con lectinas (proteínas de membrana que reconocen azúcares).²⁵²

²⁵⁰ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111. A. Guerra, R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8762-8766.

²⁵¹ D. Seebach, J. L. Matthews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher, L. B. McCusker, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173-182.

²⁵² F. Fujimura, T. Hirata, T. Morita, S. Kimura, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2394-2400. F. Fujimura, Y. Horikawa, T. Morita, J. Sugiyama, S. Kimura, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 611-616.

Ha sido posible aumentar sensiblemente la distancia entre el grupo amino y el grupo ácido de los monómeros precursores de CPs a base de incrementar la rigidez de los Aas para minimizar la libertad conformacional y dirigir la planarización una vez realizada la ciclación. En esta línea, el grupo de Dory presentó un nuevo tipo de δ -CPs formados por tres δ -aminoácidos α,β -insaturados cuyo doble enlace presenta una disposición *trans*, la cual favorecía el proceso de autoensamblaje para dar nanotubos. Al igual que sucedía con los β -CPs, los grupos formadores de enlace de hidrógeno estaban segregados en las caras opuestas, dando lugar a interacciones de lámina paralela con la anisotropía previamente comentada.

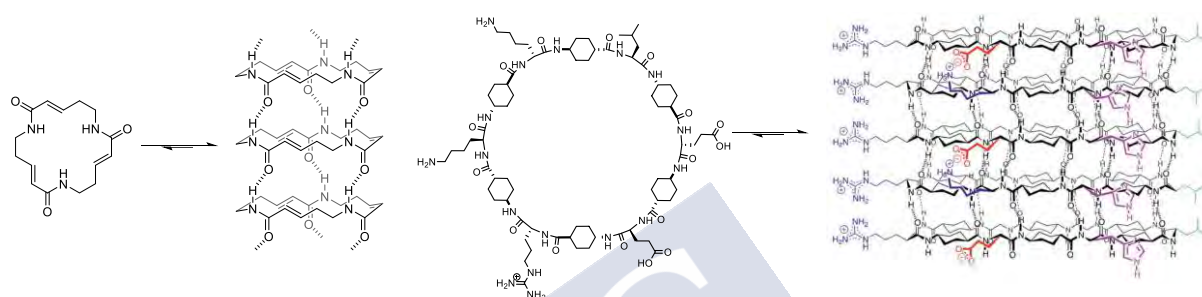


Figura 34. CP desarrollado por Dory basado en el ácido (*E*)-5-aminopent-3-enoico y α,δ -CP desarrollado en nuestro grupo de investigación para la encapsulación de fullereno C_{60} .

En nuestro grupo de investigación también se han empleado recientemente δ -Aas rígidos para la construcción de CPs, aunque en este caso sea en combinación con otros tipos de Aas. En estos diseños, la rigidez viene determinada por la utilización del ácido *trans*-4-aminociclohexanocarboxílico, cuya conformación está restringida, presenta los grupos amina y ácido en una disposición ecuatorial y relativamente plana, lo que lo hace un candidato ideal para la preparación de CPs. En esta dirección, se ha combinado este δ -Aa cíclico tanto con α como con γ -Aas,²⁵³ en los que se produce una alternancia de la quiralidad, puesto que podría considerarse que el único papel de los residuos δ es el de actuar de espaciador entre el resto de los componentes. De esta manera, dado su ángulo de 180° , es posible obtener no solo ciclos de gran tamaño (se han descrito hasta macrociclos de 16 eslabones) sino que las formas que presentan contienen ángulos más marcados, ya que toda la torsión del sistema recae en los otros residuos. Estos sistemas de gran tamaño interno han sido utilizados recientemente para preparar nanotubos con capacidad de encapsular, y por tanto solubilizar, C_{60} .²⁵⁴

Por último, cabe destacar que se ha llegado a describir por parte de Horne *et al.* el autoensamblaje de un $2\alpha,\epsilon$ -CP mediante una estrategia sintética muy elegante en la cual la etapa de ciclación es a la vez el paso en el que se genera el esqueleto de los dos ϵ -Aa. En este caso, prepararon un dipéptido que incluía en sus extremos un grupo azida y un grupo alquino, los cuales se hicieron reaccionar mediante química *click* para lograr las dos transformaciones en una única etapa. El triazol generado se situaba con una orientación paralela al eje del tubo, por

²⁵³ A. Guerra, *Diseño y síntesis de ciclopeptidos que contienen γ - y/o δ -aminoácidos cíclicos y estudio de sus propiedades de autoensamblaje: síntesis de nuevos nanotubos peptídicos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2017).

²⁵⁴ A. Lamas, A. Guerra, M. Amorín, J. R. Granja, *Chem. Sci.* **2018**, 9, 8228-8233.

lo que no modificaba las propiedades internas de la cavidad, restringiendo en parte la utilización de esta estrategia para la preparación de CPs con funcionalización interna.²⁵⁵

1.3.4. Aplicaciones de los sistemas supramoleculares basados en CPs

Como hemos comentado anteriormente, los nanotubos autoensamblados a través del apilamiento de CP han supuesto un importante avance en el campo nanotecnológico y las múltiples familias que se han desarrollado en estos últimos años han sido utilizadas para llevar a cabo diferentes funciones en campos tan diversos como la química médica, la ciencia de materiales o los dispositivos fotoelectrónicos, como veremos a continuación.

Las dimensiones controladas de la cavidad de los nanotubos autoensamblados ha permitido el desarrollo de sensores dinámicos²⁵⁶ de iones basados en la difusión relativa que estas especies cargadas presentan a través de su cavidad. Para ello se prepararon *D,L*- α -ciclooctapéptidos hidrofóbicos que se depositaron sobre una monocapa autoensamblada rica en organosulfuros de cadena larga, de tal manera que se pudieron añadir especies organometálicas de igual carga pero diferente tamaño para determinar su actividad redox mediante la técnica de voltametría cíclica, donde solo mostraban actividad las de tamaño adecuado.

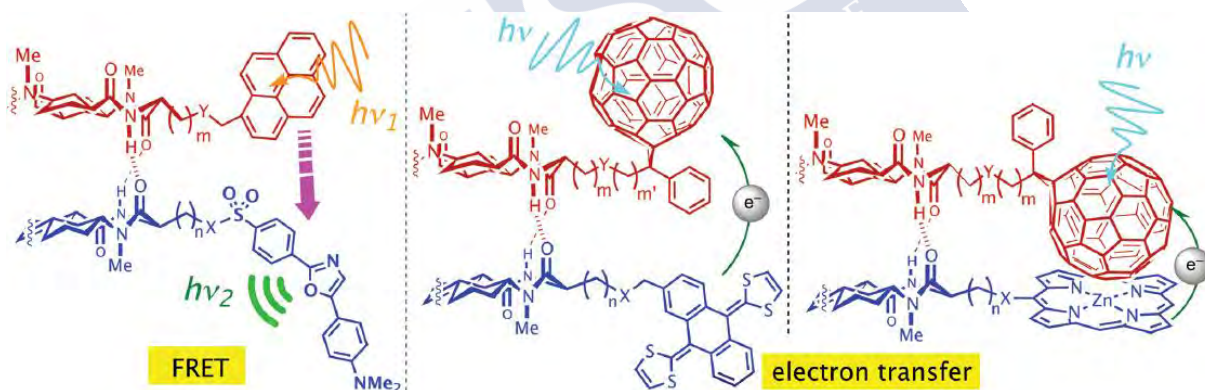


Figura 35. Sistemas heterodiméricos empleados como parejas FRET y sistemas de transferencia electrónica.²⁵⁷⁻²⁵⁹

Las propiedades de heterodimerización de los α,γ -CPs construidos con sistemas Acp/Ach han permitido el desarrollo de sistemas multicomponente de transferencia electrónica. En esta línea, se han sintetizado CP complementarios que equipan en su parte externa (anclaje vía cadena lateral) unidades de pireno y de dapoxilo, mediante los que fue posible crear un sistema multicomponente de ciclopéptidos fluorescentes que permite controlar la señal de fluorescencia empleando el sistema FRET (*Fluorescence Emission Energy Transfer*).²⁵⁷ Este tipo de aproximaciones heterodiméricas también ha permitido la preparación de sistemas de

²⁵⁵ W. S. Horne, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9372-9376.

²⁵⁶ K. Moteshare, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11306-11312.

²⁵⁷ R. J. Brea, M. E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1653-1657.

transferencia de carga basados en un derivado de tetratíafulvaleno π -extendido y un fullereno (aceptor de electrones). La disposición controlada de ambas unidades en las cadenas laterales facilita que, tras la fotoexcitación del primero, se transfiera un electrón al segundo.²⁵⁸ Más recientemente esta estrategia se ha extendido mediante la utilización de metaloporfirinas como entidades dadoras (Figura 35).²⁵⁹

Otro de los campos en los que los CP autoensamblantes han tenido más influencia es en el desarrollo de nuevos materiales. En esta línea, las posibilidades químicas que ofrecen las diferentes cadenas laterales de los α -Aa, tanto naturales como sintéticos, han sido utilizadas para dar lugar a nuevos materiales híbridos con partes centrales peptídicas conjugadas con coronas poliméricas. De esta forma, desde los trabajos pioneros de Biesalski en 2005,²⁶⁰ ha sido posible obtener materiales micro o nanoporosos basados en copolímeros de bloque, donde los canales presentan una orientación muy precisa.²⁶¹ Usando esta estrategia, se han podido anclar unidades de norborneno a las cadenas laterales de CP mediante enlaces éster de tal manera que, tras el autoensamblaje del tubo y la polimerización de las unidades ancladas a las cadenas laterales, es posible hidrolizar dicho enlace éster y dar lugar a poros funcionalizados con grupos carboxilato, que se originan tras la retirada de los nanotubos.²⁶² Además, el grupo de Perrier ha logrado demostrar que las unidades poliméricas son capaces de proteger el entorno peptídico de la acción de diferentes disolventes que compiten por los enlaces de hidrógeno, así como de mostrar que existe una relación inversa entre el tamaño de las cadenas poliméricas que se unen a los CPs y la longitud final del nanotubo que se forma, proponiendo uno de los primeros ejemplos de control de la longitud de estas especies autoensambladas.²⁶³ Este mismo grupo ha aprovechado la topología privilegiada de estas estructuras para disponer diferentes grupos polimerizables a ambos lados de un nanotubo y poder preparar así nanotubos de dos caras, que bautizaron como “nanotubos Jano”,²⁶⁴ los cuales presentaron actividad transportadora sensible al tamaño de los analitos.²⁶⁵ Usando una estrategia similar, en nuestro grupo se ha funcionalizado el exterior de CPs con diferentes dendrímeros, los cuales presentan propiedades mesogénicas y se asocian en fases columnares de tipo cristal líquido, que podrían ser utilizados como nuevos precursores de poros funcionalizados.²⁶⁶

²⁵⁸ R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, M. A. Herranz, L. Sánchez, N. Martín, W. Seitz, D. M. Guldi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5291-5294.

²⁵⁹ G. Aragay, B. Ventura, A. Guerra, I. Pintre, C. Chiorboli, R. García-Fandiño, L. Flamigni, J. R. Granja, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3427-3438.

²⁶⁰ J. Couet, J. D. Jeyaprakash, S. Samuel, A. Kopyshv, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297-3301.

²⁶¹ M. G. J. ten Cate, N. Severin, H. G. Börner, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7831-7838. T. Xu, N. Zhao, F. Ren, R. Hourani, M. T. Lee, J. Y. Shu, S. Mao, B. A. Helms, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1376-1384. R. Gokhale, J. Couet, M. Biesalski, *Phys. Status. Solidi A* **2010**, *207*, 878-883.

²⁶² M. Potnuru, N. Madhavan, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 31-35.

²⁶³ R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 1169-1172. G. Gody, D. A. Roberts, T. Maschmeyer, S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 4061-4068. R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1956-1963.

²⁶⁴ M. Danial, C. M.-N. Tran, P. G. Young, S. Perrier, K. A. Jolliffe, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2780-2793.

²⁶⁵ M. Danial, C. M.-N. Tran, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8018-8026.

²⁶⁶ M. Amorín, A. Pérez, J. Barberá, H. L. Ozores, J. L. Serrano, J. R. Granja, T. Sierra, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 688-690.

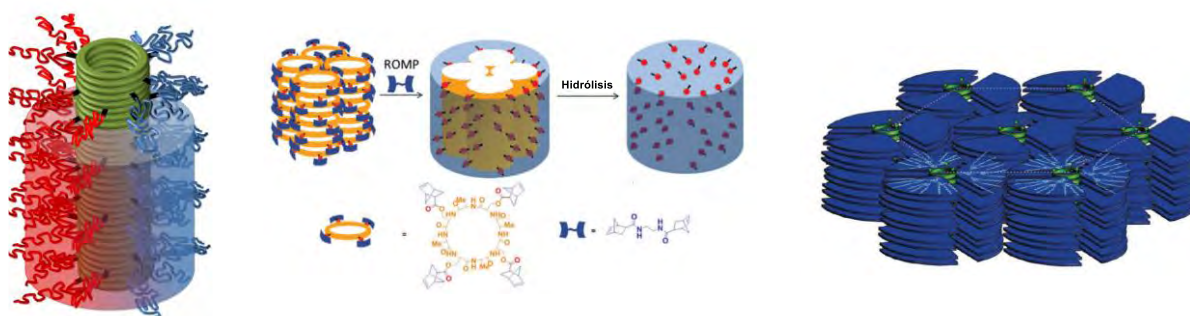


Figura 36. Izquierda: Híbrido de nanotubo peptídico y corona polimérica con dos secciones diferenciadas.²⁶⁴ Centro: Estrategia basada en la polimerización de las cadenas laterales funcionalizadas con norborneno para generar membranas con poros ricos en carboxilatos.²⁶² Derecha: Fases columnares tipo cristal líquido generadas a partir de dímeros de CPs funcionalizados con dendrímeros.²⁶⁶

Explotando el concepto de funcionalización externa, en nuestro grupo de investigación se han utilizado α,γ -CPs que incorporan cadenas laterales con grupos pireno, las cuales facilitan el apilamiento entre los diferentes anillos y por tanto la formación de nanotubos. Estos péptidos han sido caracterizados por diversas técnicas de microscopía. Adicionalmente, los grupos de pireno han posibilitado la conjugación de estos nanotubos peptídicos con nanotubos de carbono, en los que las interacciones de tipo π juegan un papel clave, dando lugar a sistemas supramoleculares híbridos inéditos hasta ese momento que presentaban las propiedades de ambos componentes.²⁶⁷ Además, estos sistemas demostraron tener la capacidad de alinear en sus márgenes nanoclústers de plata, un proceso que no es sencillo mediante otras técnicas (Figura 37, izquierda).²⁶⁸

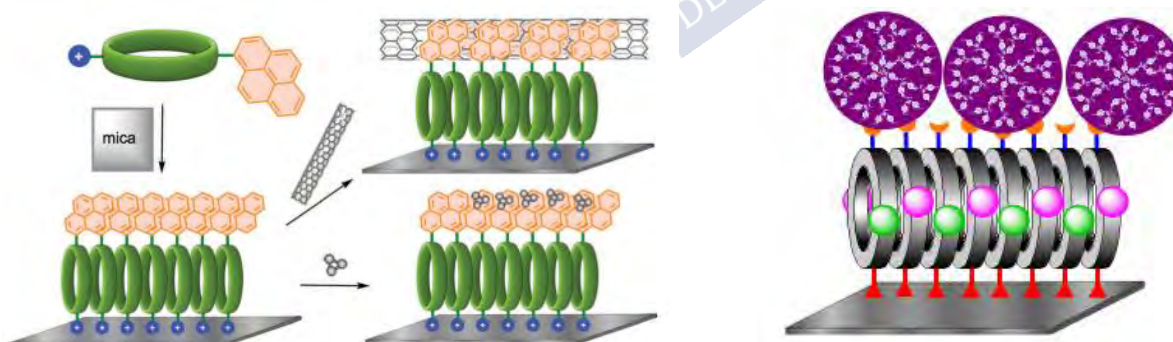


Figura 37. Nanotubos basados en CPs funcionalizados con pireno para el alineamiento de nanotubos de carbono, clústeres metálicos o dendrímeros y proteínas.^{268,269}

²⁶⁷ J. Montenegro, C. Vázquez-Vázquez, A. Kalinin, K. E. Geckeler, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

²⁶⁸ M. Cuerva, R. García-Fandiño, C. Vázquez-Vázquez, M. A. López-Quintela, J. Montenegro, J. R. Granja, *ACS Nano* **2015**, *11*, 10834-10843.

Muy recientemente, ha sido posible combinar el uso del pireno con una aproximación covalente dinámica que permite a los nanotubos ciclopeptídicos actuar como plantilla 1D para lograr depositar en superficies funcionales proteínas o nanopartículas con un alineamiento muy preciso (Figura 37, derecha).²⁶⁹

En el campo de la nanoelectrónica, el ordenamiento monodimensional de los nanotubos peptídicos los convierte en candidatos privilegiados para el desarrollo de nanocables o sistemas con capacidad conductora en espacios muy reducidos. Con este objetivo, se han decorado CPs con unidades de diimida 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílica (NDI) unidas a través de cadenas laterales de lisina, dando lugar a nanotubos electrónicamente deslocalizados en donde las unidades de NDI quedaban alineadas (Figura 38, derecha).²⁷⁰ Este sistema se ha extendido a cables moleculares 1D mediante el empleo de un α,γ -CP acoplado a un grupo C₆₀. Este diseño producía nanotubos en los que las unidades de fullereno formaban dos hileras que flanqueaban al esqueleto peptídico (Figura 38, izquierda).²⁷¹ Existen también ejemplos de β -ciclopeptidos decorados con unidades de tetratíafulvaleno (TTF), que conducían al alineamiento de los grupos en la estructura tubular resultante, exhibiendo propiedades típicas de semiconductores tipo *p*.²⁷²

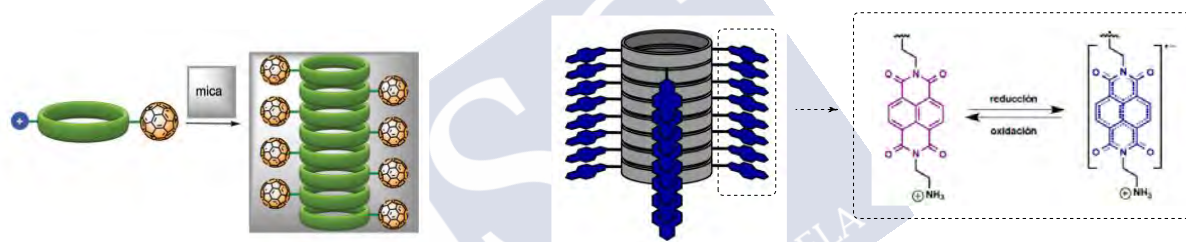


Figura 38. Alineamiento 1D de fullereno (izquierda) y NDI (derecha) en la superficie de nanotubos peptídicos autoensamblados.^{270,271}

En el terreno de la química biológica, estas arquitecturas supramoleculares también han encontrado cabida para el desarrollo de su potencial. Una de las primeras aplicaciones se basó en su uso como agentes antimicrobianos, tras comprobar que si se diseñaban secuencias que combinaran residuos hidrofóbicos en una región con residuos cargados en la opuesta, los CPs resultantes podían presentar una disposición paralela a las membranas lipídicas (Figura 39). Este mecanismo de inserción en las bicapas tipo mosaico o alfombra provoca un incremento de la permeabilidad de las membranas, lo que convierte a estos compuestos en agentes citotóxicos²⁷³ y o antimicrobianos.²⁷⁴ Una gran variedad de *D,L*- α -CPs han demostrado

²⁶⁹ J. M. Priegue, *Tácticas supramoleculares para el desarrollo de nuevos biosensores, agentes de transfección y nanoimpresión molecular* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2018).

²⁷⁰ N. Ashkenasy, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, *Small* **2006**, 2, 99-102.

²⁷¹ C. Reiriz, R. J. Brea, A. Arranz, J. L. Carrascosa, A. Garibotti, B. Manning, J. M. Valpuesta, R. Eritja, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11335-11337.

²⁷² H. Uji, H. Kim, T. Imai, S. Mitani, J. Sugiyama, S. Kimura, *Biopolymers* **2016**, 106, 275-282.

²⁷³ J. T. Fletcher, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4008-4013.

²⁷⁴ S. Fernández-López, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado; J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452-455. W. S. Horne, C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxon, M. Amorín, M. R. Ghadiri, G. R. Nemerow, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13,

propiedades bactericidas o bacteriostáticas, generalmente siendo más activos frente a bacterias Gram-positivas.²⁷⁵ En general, se observa que la actividad antibacteriana de los hexapéptidos cíclicos es menor que la de los octapéptidos, y que el incremento de residuos básicos aumenta la actividad.²⁷⁴ Con posterioridad a los estudios iniciales en este campo y tras el descubrimiento de los glicociclopéptidos conocidos como manopeptimicinas,²⁷⁶ se llevó a cabo la preparación de una segunda generación de CPs antimicrobianos que estaban modificados con sacáridos en sus cadenas laterales. Esta glicosilación no pareció afectar a su actividad frente a las bacterias, pero aumentó notablemente la solubilidad de estos macrociclos y redujo considerablemente la actividad hemolítica que presentaban, aumentando por tanto la selectividad de estos agentes antimicrobianos.²⁷⁷

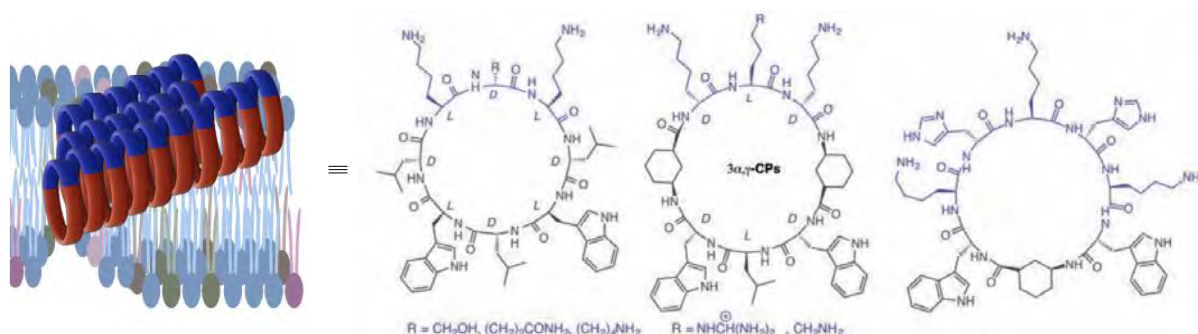


Figura 39. Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos que operan con un mecanismo tipo alfombra basados en la incorporación de regiones catiónicas y lipófilas en extremos opuestos del ciclo, en los que se combinan diferentes tipos de combinaciones aminoacídicas.

Además de sus características antimicrobianas, los CPs han sido utilizados en química médica para facilitar el transporte de fármacos de manera selectiva. De este modo, se ha promovido la internalización intracelular de fármacos antitumorales como el 5-fluoracilo (5-FU), el que presentó la mayor velocidad de difusión en presencia de un *D,L*- α -CP formador de canales transmembranales, lo que condujo a una actividad antitumoral mejorada.²⁷⁸ También en el campo del *drug delivery*, se ha utilizado la conjugación externa de un CP a un polímero capaz de conjugar un fármaco para aumentar su eficiencia. En esta línea, el agente anticanceroso RAPTA-C fue anclado a un híbrido de péptido/polímero que aumentó 10 veces su eficiencia al ser comparado con el fármaco en solitario.²⁷⁹ Más recientemente esta metodología ha sido empleada para el aumento de la eficiencia de fármacos basados en compuestos de órgano-iridio

5145-5153. V. Dartois, J. Sánchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. R. Granja, C. Gritzen, D. Weinberger, M. R. Ghadiri, T. R. Parr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3302-3310. L. Motiei, S. Rahimipour, D.A. Thayer, C.-H. Wong, M. R. Ghadiri, *Chem. Commun.* **2009**, 3693-3695.

²⁷⁵ N. Rodríguez-Vázquez, H. L. Ozores, A. Guerra, E. González-Freire, A. Fuertes, M. Panciera, J. M. Priegue, J. Outeiral, J. Montenegro, R. García-Fandiño, M. Amorín, J. R. Granja, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 2647-2661.

²⁷⁶ H. He, R. T. Williamson, B. Shen, E. I. Graziani, H. Y. Yang, S. M. Sakya, P. J. Petersen, G. T. Carter, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9729-9736.

²⁷⁷ L. Motiei, S. Rahimipour, D. A. Thayer, C.-H. Wong, M. R. Ghadiri, *Chem. Comm.* **2009**, 25, 3693-3695.

²⁷⁸ J. Chen, B. Zhang, F. Xia, Y. Xie, S. Jiang, R. Su, Y. Lu, W. Wu, *Nanoscale* **2016**, 8, 7127-7136.

²⁷⁹ B. M. Blunden, R. Chapman, M. Danial, H. Lu, K. A. Jolliffe, S. Perrier, M. H. Stenzel, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 12745-12749.

(Figura 40).²⁸⁰ Por último, se planteó que, puesto que los péptidos anfipáticos con residuos básicos presentan similitudes estructurales con las placas amiloides, sería interesante probar su actividad como inhibidores de la agregación de las proteínas A β hacia formas tóxicas, lo que podría tener implicaciones en la lucha contra el Alzheimer,²⁸¹ o la inhibición de la agregación de la α -sinucleína, que se asocia a la enfermedad de Parkinson.²⁸² Recientemente, en nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo estudios sobre la formación de geles que responden a estímulos como el pH basados en nanotubos ciclopeptídicos, que se espera que en el futuro puedan tener importantes implicaciones en el desarrollo de sistemas que emulen el citoesqueleto celular.²⁸³

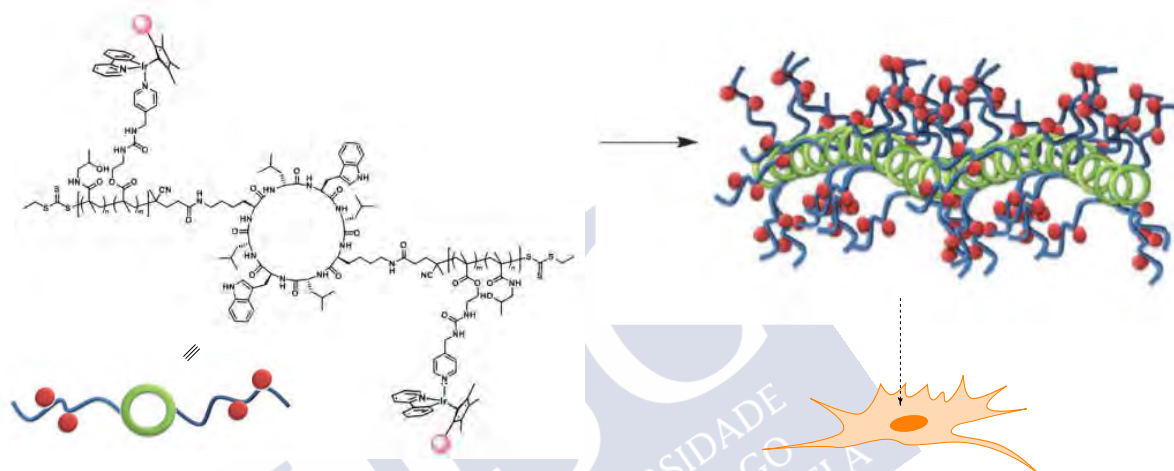


Figura 40. Ejemplo de híbrido de CP y polímero que compleja un fármaco de iridio para aumentar su eficiencia de entrega en las células objetivo.²⁸⁰

Finalmente, cabe destacar que, dada la posibilidad de generar cavidades huecas cuyas propiedades externas se modulen a la carta, se han desarrollado ciclopeptidos precursores de nanotubos que actúan como canales de membrana.²⁸⁴ Además, como ya se ha dicho con anterioridad, estas nanoestructuras presentan la posibilidad de modificar el número de residuos presentes en los macrociclos para modificar las dimensiones del canal. Esta idea se ha explotado con el fin de desarrollar sistemas selectivos al transporte del analito que se quiere transportar, como vimos anteriormente para el caso de fármacos.²⁷⁸ Usando esta estrategia ha sido posible

²⁸⁰ S. C. Larnaudie, J. C. Brendel, I. Romero-Canelón, C. Sanchez-Cano, S. Catrouillet, J. Sanchis, J. P. C. Coverdale, J.-I. Song, A. Habtemariam, P. J. Sadler, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Biomacromolecules* **2018**, 19, 239-247.

²⁸¹ M. Richman, S. Wilk, M. Chemerovski, S. K. T. S. Wärmländer, A. Wahlström, A. Gräslund, S. Rahimipour, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3474-3484.

²⁸² M. Chemerovski-Glikman, E. Rozentur-Shkop, M. Richman, A. Grupi, A. Getler, H. Y. Cohen, H. Shaked, C. Wallin, S. K. T. S. Wärmländer, E. Haas, A. Gräslund, J. H. Chill, S. Rahimipour, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 14236-14246.

²⁸³ A. Méndez-Ardoy, J. R. Granja, J. Montenegro, *Nanoscale Horiz.* **2018**, 3, 391-396.

²⁸⁴ M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, 369, 301-304. N. Rodríguez-Vázquez, H. L. Ozores, A. Guerra, E. González-Freire, A. Fuertes, M. Panciera, J. M. Priegue, J. Outeiral, J. Montenegro, R. García-Fandiño, M. Amorín, J. R. Granja, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 2647-2661.

transportar glucosa²⁸⁵ o ácido glutámico²⁸⁶ con *D,L*- α -ciclododecapéptidos pero no con octapéptidos, lo que evidencia la capacidad de estos nanotubos para realizar un cribado en base al tamaño de su cavidad, impidiendo el paso de sustancias mayores a dicho poro. Estos ciclos de menor tamaño, al igual que otros α,γ -CPs, cuando se componen de residuos hidrofóbicos, han demostrado tener la capacidad para transportar iones de un lado a otro de las membranas lipídicas, aspecto en el que nos centraremos con más detenimiento en la siguiente sección de esta Introducción.

2. Transporte transmembranal de iones

2.1. Sistemas naturales

Podría considerarse que la compartimentalización ha sido uno de los procesos fundamentales a lo largo de la evolución de los sistemas biológicos. Desde la sopa primordial hasta el *homo sapiens* pasando por las bacterias extremófilas, los procesos evolutivos han ido generando una compleja maquinaria biológica que, en muchos casos, se fundamenta en la posibilidad de desempeñar funciones específicas en entornos aislados, de donde emana la selectividad que presentan la mayoría de los procesos naturales. Sin lugar a dudas, uno de los actores fundamentales en el proceso de compartimentalización han sido las membranas biológicas, las cuales han propiciado la aparición de organismos pluricelulares o la propia especialización de los diferentes orgánulos dentro de una misma célula, haciendo que los organismos compartimentalizados contasen con una mayor eficiencia en sus procesos vitales. Estas membranas biológicas no solo son las responsables de establecer una separación entre diferentes compartimentos, sino que juegan un papel clave en multitud de procesos celulares como el mantenimiento de la homeostasis entre ambos lados de la membrana, el tránsito de nutrientes hacia dentro de las células o la secreción de los residuos hacia el exterior, así como la comunicación entre diferentes compartimentos celulares o entre células diferentes (transducción de señales y regulación de procesos).²⁸⁷

A pesar de que la composición de estas membranas es tremendamente variada y depende de una infinidad de factores, se puede considerar que el componente fundamental y mayoritario de esta compleja mezcla de moléculas son los fosfolípidos. Esta familia de compuestos se caracteriza por estar formada por dos colas de ácidos grasos hidrofóbicas que se unen a una cabeza que contiene un grupo fosfato (hidrofílico) a través de una unidad de glicerol.²⁸⁸ Los fosfolípidos tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en medio acuoso dando lugar a bicapas que exponen las cabezas polares hacia el agua mientras que recluyen en su región interna las colas hidrofóbicas hidrocarbonadas, evitando el contacto directo con el agua. Son estas bicapas las que, al cerrarse sobre si mismas pueden originar compartimentos (vesículas, orgánulos, células, etc.) donde las propiedades intra- y extramembranales pueden ser diferentes.

No obstante, dado el carácter fuertemente hidrofóbico del interior de las bicapas lipídicas, esta compartimentalización provoca que se restrinja casi totalmente el tránsito de analitos

²⁸⁵ J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

²⁸⁶ J. Sanchez-Quesada, H. S. Kim, M. R. Ghadiri, *Ang. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506.

²⁸⁷ D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman, New York, **2009**.

²⁸⁸ R. L. Yeagle, *The Structure of Biological Membranes*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, **2005**.

polares a través de ellas, por lo que los sistemas naturales han tenido que desarrollar mecanismos para solventar este inconveniente. Mientras que las biomoléculas cargadas de gran tamaño como proteínas, oligosacáridos o ácidos nucleicos pueden entrar y salir de las células mediante procesos de endo- y exocitosis, respectivamente, los analitos polares y/o cargados de menor tamaño no son capaces de desencadenar ese mecanismo de internalización.²⁸⁹ Por el contrario, la Naturaleza ha desarrollado un componente adicional de las membranas para que se encargue del tránsito de pequeñas moléculas polares y iones, como son las proteínas transportadoras de membrana. Estas estructuras son fundamentales para controlar el potencial de membrana, que se define como la diferencia de potencial eléctrico (derivado de un gradiente iónico) entre el interior y el exterior de la célula, y que es fundamental en multitud de funciones biológicas vitales. Además, ciertas células, denominadas células excitables (neuronas o células musculares), tienen la función explícita de generar o transmitir señales eléctricas, lo que también se lleva a cabo mediante este tipo de compuestos, generalmente iones.

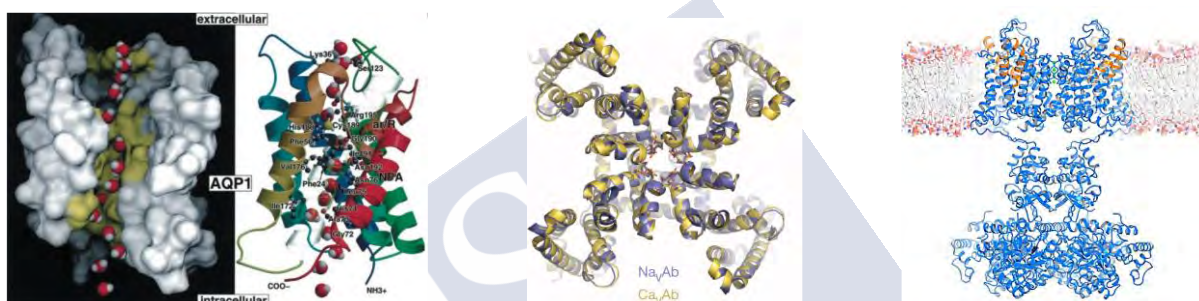


Figura 41. Diferentes tipos de proteínas transportadoras como las acuaporinas²⁹⁰ (izquierda), y los canales de Ca^{2+} (centro) o K^{+} (derecha).^{291,292}

A pesar de que existen numerosos tipos de proteínas transportadoras, como veremos a continuación, sus características químicas suelen ser bastante similares independientemente de qué analito transloquen o cómo lleven a cabo el transporte. En esta línea, la mayoría de las proteínas de este tipo cuentan con una superficie externa rica en residuos hidrofóbicos, de tal manera que la inserción en la parte apolar de la membrana esta favorecida por su lipofilia. Por otro lado, el canal interno por el que circulan los analitos polares suele estar dotado con residuos hidrofílicos que actúan, dependiendo del tipo de proteína, favoreciendo la formación de un pequeño canal de agua de un lado a otro de la bicapa o sustituyendo la esfera de hidratación de los iones de interés a lo largo de su camino a través de la bicapa. En ocasiones, ambos comportamientos coexisten en una misma proteína de membrana, en la que se puede llegar a observar una constricción con una zona más estrecha a lo largo del canal, que se conoce como

²⁸⁹ M. Miaczynska, H. J. Stenmark, *Cell Biol.* **2008**, *180*, 7-11.

²⁹⁰ B. L. de Groot, H. Grubmüller, *Science* **2001**, *294*, 2353-2357.

²⁹¹ L. Tang, T. M. Gamal El-Din, J. Payandeh, G. Q. Martínez, T. M. Heard, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, *Nature* **2014**, *505*, 56-61.

²⁹² D. Doyle, J. Cabral, R. Pfuetzner, A. Kuo, J. Gulbis, S. Cohen, B. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69-77.

filtro de selectividad. Es en esta región en la que se selecciona, en base a este tipo de interacciones con aminoácidos cargados, qué ion puede migrar de un lado al otro.

Las proteínas transportadoras de membrana se pueden clasificar atendiendo a varios factores, aunque lo más típico es separarlas en aquellas que desempeñan un transporte considerado activo (requieren la hidrólisis de ATP para trabajar) o pasivo (no consumen energía). Estas últimas funcionan a favor del gradiente osmótico, con velocidades de transporte de iones cercanas a la difusión de estos en medio acuoso, y normalmente fluctúan entre un estado cerrado (en el que pasan la mayor parte del tiempo) y un estado abierto, provocado por cambios conformacionales tras una señal específica. Por otro lado, los transportadores de tipo activo, también denominadas bombas, requieren de una fuente de energía externa para superar el coste termodinámico asociado al movimiento de iones en contra del gradiente de concentración o carga. Otra posible clasificación se deriva de la cantidad de analitos que transportan simultáneamente y el modo en que lo hacen (Figura 42). Así, los transportadores que solo mueven un analito en una dirección se denominan *uniport*, mientras que los que son capaces de movilizar más de una molécula a la vez se conocen como cotransportadores. Estos últimos se dividen en *symporters*, si el sentido de transporte es el mismo para todos los analitos, o *antiporters*, si el sentido de migración entre dos analitos es opuesto. Sean del tipo que sean, estas proteínas juegan un papel fundamental a nivel biológico, por lo que su mal funcionamiento o su ausencia por motivos congénitos desemboca en la aparición de dolencias severas que se conocen como canalopatías, de las que quizás el ejemplo más conocido es la fibrosis quística.²⁹³

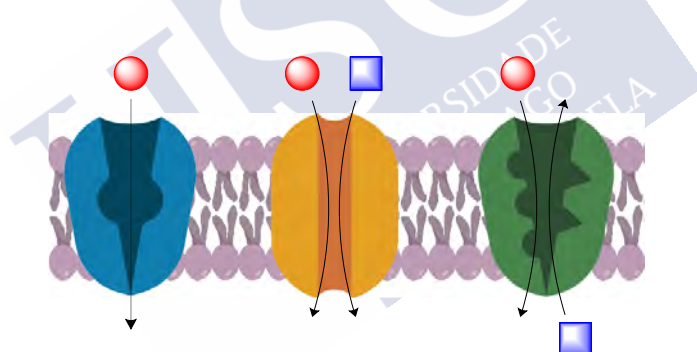


Figura 42. Clasificación de los modelos de transporte atendiendo a la estequiometría y direccionalidad del transporte. De izquierda a derecha: *uniport*, cotransporte tipo *symport* y cotransporte tipo *antiport*.³²

Además de los canales y las bombas de membrana, existen otro tipo de proteínas de membrana capaces de formar poros en las bicapas. Dentro de este grupo se encuentran las hemolisinas²¹⁰ y las gramicidinas,²⁰³ las cuales carecen de estados abierto/cerrado y de selectividad. Simplemente actúan favoreciendo la permeabilidad de las membranas y afectando a su homeostasis, por lo que son consideradas como toxinas. Además de estructuras proteicas formadoras de canales, se han descrito moléculas de tamaño más reducido que también tienen capacidad para transportar iones a pesar de no generar un canal continuo de un lado a otro de la bicapa fosfolipídica (Figura 43). Estas moléculas se definen como ionóforos (o en ocasiones *carriers*) y se componen generalmente de macrociclos (ciclopéptidos, depsipéptidos, macrólidos, etc.) con una cavidad hidrofílica, donde complejan los iones, y un exterior

²⁹³ R. Planells-Cases, T. J. Jentsch, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1792, 173-189.

hidrofóbico, que permite su migración a través del interior apolar de los lípidos. Estos transportadores se unen a los analitos en la interfase fosfolípido-agua de un lado de la membrana, formando un complejo que es capaz de migrar a través de esta gracias a su lipofilia externa, para finalmente liberar su carga del lado opuesto de la membrana. Muchas de estas sustancias se han descubierto estudiando las secreciones de microorganismos, ya que este tipo de ionóforos se utilizan como medio de defensa natural frente a otros organismos competidores. Es por ello por lo que algunos de estos sistemas se utilizan como antibióticos en la actualidad, puesto que su capacidad para ejercer transporte pasivo es tan efectiva que puede llegar a destruir los potenciales de membrana requeridos para la subsistencia de muchas bacterias u hongos.²⁹⁴

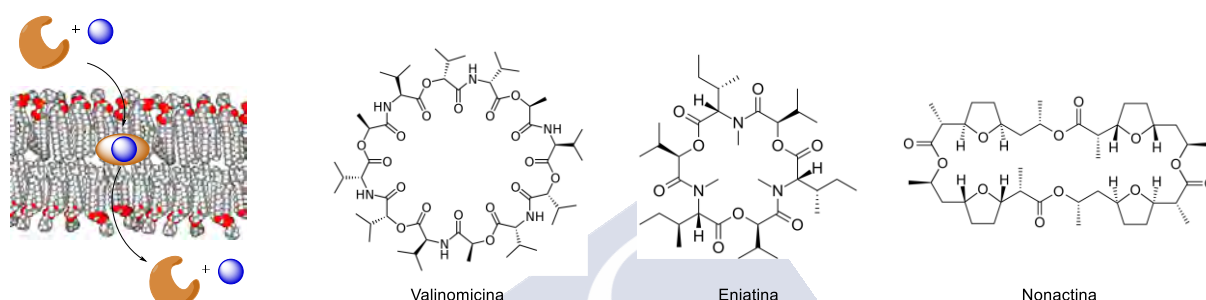


Figura 43. Transporte mediante el modelo de tipo ionóforo basado en la migración del complejo receptor-ligando a través de la bicapa, además de algunos ejemplos de ionóforos naturales que transportan iones.³²

Debido a la relevancia biológica de las proteínas e ionóforos naturales, los químicos sintéticos han intentado emular sus propiedades de manera artificial mediante el desarrollo de nuevas moléculas que, mediante diversos mecanismos de acción, sean capaces de inducir un transporte de analitos a través de una membrana lipídica. A continuación, se hará una breve revisión de algunas de estas moléculas, centrándonos únicamente en aquellas capaces de transportar iones de relevancia biológica y en la que no se cubrirán las aproximaciones basadas en la formación de un canal transmembranal definido de elevado tiempo de vida por motivos de concreción (este tema se cubrirá brevemente en la parte inicial del Capítulo II).

2.2. Membrane spanners

Además de los mecanismos naturales previamente citados, se ha descubierto que también existen moléculas que combinan partes flexibles y rígidas en su estructura y que no están diseñadas para, en principio, adquirir una determinada estructura secundaria tras su contacto con las membranas. Esta familia se conoce mediante el término inglés de *membrane spanners*,

³² N. Rodríguez-Vázquez, A. Fuertes, M. Amorín, J. R. Granja, "Bioinspired Artificial Sodium and Potassium Ion Channels" En *The Alkali Metals Ions: Their Role for Life*, Vol. 16; Springer International, Cham, **2016**.

²¹⁰ L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, *Science* **1996**, 274, 1859-1866.

²⁰³ D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 2011-2025.

²⁹⁴ M. Antoszczak, D. Steverding, A. Huczyński, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 166, 32-47.

que podría traducirse como “moléculas que atraviesan una membrana”.²⁹⁵ Como su propio nombre indica, las cadenas móviles de su estructura generalmente son lo suficientemente largas como para que una misma molécula transportadora se extienda de un lado al otro de una bicapa abarcándola por completo. El mecanismo mediante el cual son capaces de transportar iones, aunque no está completamente claro,²⁹⁶ se basa en inducir una permeabilidad parcial en las membranas, ya sea mediante la formación de pequeños poros de tamaño subnanométrico que alojen moléculas de agua o mediante la inducción de estrés mecánico debido a los contactos entre las dos capas de la membrana y las cadenas del propio transportador, que en parte impide el movimiento independiente de ambas mitades de la bicapa favoreciendo zonas temporalmente permeables en su seno.²⁹⁷ En cualquier caso, parece claro que no forman ningún canal que quede definido de forma permanente en la membrana y que no se unen de manera específica a los iones que transportan. En muchas ocasiones presentan una actividad dependiente del potencial eléctrico entre ambos lados de la membrana y es habitual que la etapa limitante sea su inserción en las bicapas, la cual se asemeja al proceso de *flip-flop*, tras la que pueden dar lugar a agregados o a formas torsionadas y plegadas (Figura 44).²⁹⁸

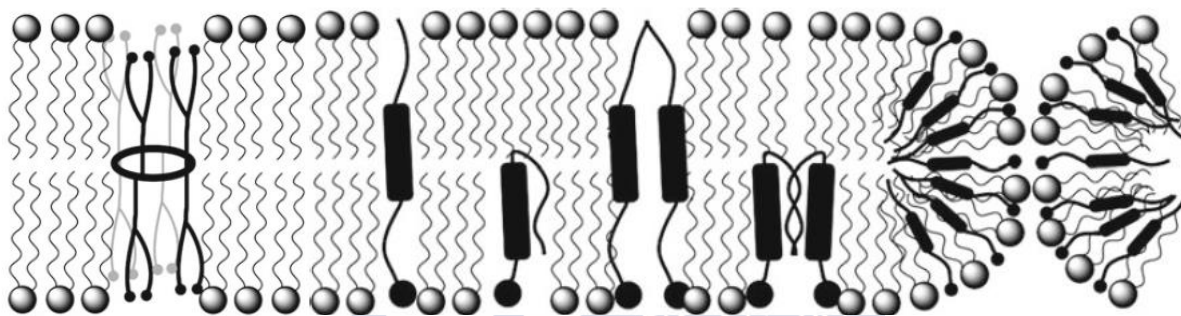


Figura 44. Diferentes modelos de compuestos que se sirven del modo de la permeabilización parcial de la membrana para inducir el proceso de transporte.

Los transportadores no tienen por qué ser entidades unimoleculares, sino que la especie activa puede formarse a partir de un proceso de agregación entre varios componentes.²⁹⁹ En muchas ocasiones los investigadores han recurrido al uso de unidades con cierta rigidez a las cuales se anclan cadenas relativamente flexibles. Existen ejemplos en los cuales estas partes rígidas se localizan en el medio de la membrana mientras que en otros modelos los autores proponen su localización en la entrada de la bicapa. También se han descrito en bibliografía ejemplos minimalistas en los que se consigue inducir un transporte mediante moléculas lineales tremendamente simples, las cuales pretenden imitar el modelo de acción de la anfotericina B.³⁰⁰

²⁹⁵ T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 335-347.

²⁹⁶ J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 148-175.

²⁹⁷ J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4169-4171.

²⁹⁸ J. T. Davis, O. Okunola, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 20, 3843-3862.

²⁹⁹ I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4601-4604.

³⁷⁸ L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, 21, 1393-1415. C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1075-1101.

³⁰⁰ C. M. McNamara, S. Box, J. M. Crawforth, B. S. Hickman, T. J. Norwood, B. J. Rawlings, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 83-88.

En las próximas líneas se recogerán algunos de los ejemplos más relevantes basados en este mecanismo que han sido utilizados para inducir el transporte de iones en membranas lipídicas.

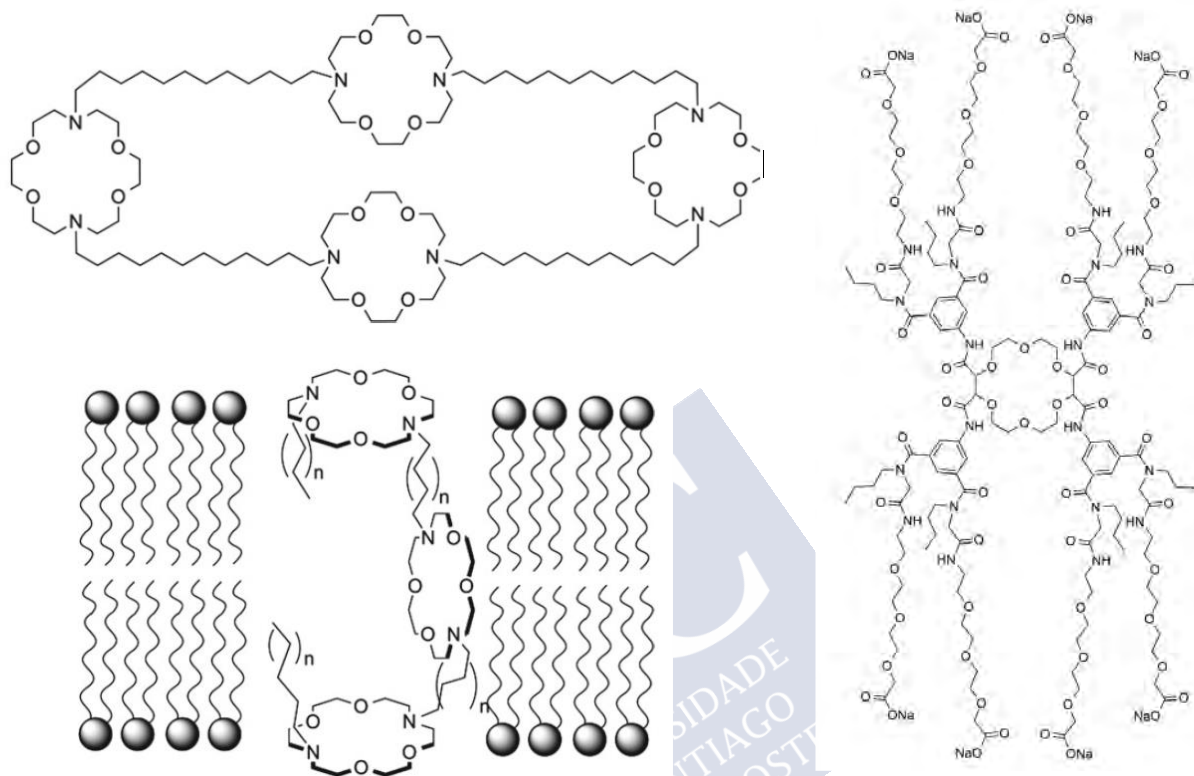


Figura 45. Ejemplos de transportadores tipo *membrane spanner* basados en éteres corona y sus derivados nitrogenados.³⁰¹⁻³⁰³

Los primeros ejemplos en este terreno fueron desarrollados por el grupo de J. M. Lehn en la década de los 80, en los que se servían de su experiencia con éteres corona para desarrollar transportadores que poseían esta unidad en su zona central. El diseño se basaba en la sustitución de dos grupos etilenglicol por unidades de ácido tartárico, las cuales permitían la incorporación de cadenas de PEG (un total de 8, dos por carboxilato) en direcciones opuestas del macrociclo. Estas cadenas de etilenglicol estaban terminadas por grupos cargados para favorecer su posicionamiento en la parte polar de la bicapa (Figura 45, derecha).³⁰¹ Con posterioridad, el grupo de Fyles llevó este diseño un paso más allá aumentando el número de unidades de ácido tartárico en el macrociclo y sustituyendo las cadenas de PEG lineales por unidades cíclicas altamente oxigenadas, que estaban terminadas con diferentes unidades cargadas o neutras (como azúcares), lo que permitió establecer relaciones estructura-actividad para el transporte de cationes alcalinos.³⁰² El grupo de Gokel diseñó sistemas basados en múltiples unidades de

³⁰¹ J. P. Behr, J. M. Lehn, A. C. Dock, D. Moras, *Nature* **1982**, 295, 526-627. J. P. Behr, J. M. Lehn, D. Moras, J. C. Thierry, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 701-703. L. Jullien, J.-M. Lehn, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3803-3806.

³⁰² T. M. Fyles, T. D. James, K. C. Kaye, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12315-12321. T. M. Fyles, T. D. James, A. Pryhitka, M. Zojaji, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7456-7468. F. R. Fronczek, R. D. Gandour, T. M. Fyles, P. J. Hocking, S. J. McDermid, P. D. Wotton, *Can. J. Chem.* **1991**, 69, 12-19.

éter corona en los que sustituían dos átomos de oxígeno por átomos de nitrógeno en uno de los macrociclos, de tal manera que se comportasen de manera mixta, con macrociclos tanto a la entrada como en el seno de la bicapa (Figura 45, izquierda).³⁰³ En este caso, la inserción en la bicapa demostró ser un proceso cinéticamente lento, pero una vez incorporado, este transportador presentaba una cierta selectividad en la permeabilización de Na⁺ frente a K⁺.³⁰⁴

De manera análoga a los derivados de éteres corona, las ciclodextrinas (CDs) también han servido como plataforma para la incorporación de cadenas flexibles en sentidos opuestos del anillo, de tal manera que estas pudieran abarcar toda la membrana.³⁰⁵ Ha sido posible incluso funcionalizar únicamente una de las caras, en cuyo caso se propone un modelo dimérico en el que las CDs ocupan la parte externa de la membrana.³⁰⁶ Dadas las propiedades únicas de las CDs se ha logrado demostrar el impacto que tiene la presencia de *guests* hidrofóbicos en el transporte, ya que estos se complejan con el interior hidrofóbico y bloquean parcialmente la cavidad de las CDs.³⁰⁷

Estudios similares con resorcin[4]arenos que poseen una cara fuertemente hidrofílica y otra rica en cadenas alquílicas largas también ha invocado la naturaleza dimérica de la especie transportadora.³⁰⁸ Curiosamente, experimentos de electrofisiología evidenciaron una cierta selectividad en el transporte de K⁺ frente al de Na⁺ o Cl⁻, similar al de algunos sistemas naturales como la gramicidina A. Otros macrociclos como los calix[4]arenos han servido como plataforma funcionalizables, en este caso con unidades de ácido cólico. Sorprendentemente, al contrario que pasaba en los modelos de las cápsulas supramoleculares descritas en la Sección 1.2.2, cuando estas moléculas actúan como transportadores la conformación 1,3-alternada es más activa que la forma cónica, lo que refleja una correlación directa entre la longitud del transportador (que debe ser similar a la de la membrana) y su capacidad de movilización de iones (Figura 46).³⁰⁹

Como comentábamos con anterioridad, las especies transportadoras no se limitan a modelos monoméricos o diméricos, sino que, en ocasiones, agregados de mayor orden han sido propuestos como especies activas. Este es el caso de los pirogalol[4]arenos descritos nuevamente por el grupo de Gokel, que mostraron un funcionamiento diferente en función de la longitud del aldehído utilizado en el proceso de macrociclación del cavitando. La especie más activa, derivada del dodecanal, se estudió en profundidad y su diámetro se pudo estimar en 11 Å mediante la ecuación de Hille,³¹⁰ lo que implica una asociación de, al menos, 6 unidades en la forma activa,³¹¹ que también fueron observadas al utilizar aldehídos ramificados.³¹²

³⁰³ A. Nakano, Q. Xie, J. V. Mallen, L. Echegoyen, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1287-1289.

³⁰⁴ G. W. Gokel, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2824-2833.

³⁰⁵ M. J. Pregel, L. Jullien, J. Canceil, L. Lacombe, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 417-426.

³⁰⁶ I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4601-4604. J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *41*, 148-175.

³⁰⁷ J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3622-3634.

³⁰⁸ Y. Tanaka, Y. Kobuke, M. Sokabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 693-694. W.-H. Chen, M. Nishikawa, S.-D. Tan, M. Yamamura, A. Satake, Y. Kobuke, *Chem. Commun.* **2004**, 872-873.

³⁰⁹ N. Maulucci, F. De Riccardis, C. B. Botta, A. Casapullo, E. Cressina, M. Fregonese, P. Tecilla, I. Izzo, *Chem. Commun.* **2005**, 1354-1356.

³¹⁰ B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edition., Sinauer Associates Inc., Sunderland, **2001**.

³¹¹ R. Li, O. V. Kulikov, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2009**, 6092-6094.

³¹² O. V. Kulikov, M. M. Daschbach, C. R. Yamnitz, N. Rath, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2009**, 7497-7499.

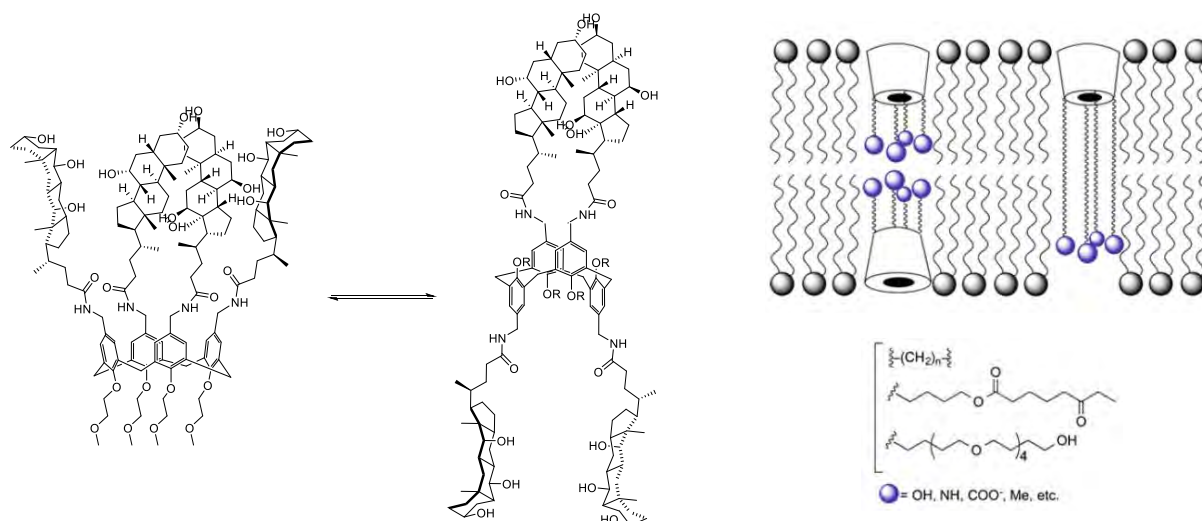


Figura 46. Izquierda: derivados de calixarenos funcionalizados con unidades de ácido cólico en la que la especie alternada (de mayor longitud) presenta mejores propiedades de transporte que el correspondiente isómero cónico.³⁰⁹ Derecha: diferentes aproximaciones basadas en el uso de un cavitando (resorcinarenos, calixarenos, ciclodextrinas, etc.) en combinación con cadenas hidrofóbicas para la preparación de moléculas que abarquen toda la bicapa.

Se han descrito otras estructuras cíclicas basadas en unidades de β -fenil-*D*-glucopiranosas unidas mediante enlaces de tipo diéster, que generalmente se conocen como CyPLOS, en los que la sustitución de los hidroxilos de las posiciones C2 y C3 con cadenas hidrofóbicas o de oligoetilenglicol permite la formación de *spanners*. En este caso, el macrociclo aniónico se localiza en la interfase lípido-agua y proyecta los “tentáculos” hacia el interior de la membrana.³¹³

La evolución de estos sistemas ha llevado a intentar reducir la complejidad supramolecular de los mismos, así como su obtención sintética. Es por ello por lo que se han desarrollado moléculas puramente lineales diseñadas para funcionar con un mecanismo similar a los anteriores ejemplos. En esta línea, abundan los sistemas que incorporan una parte central hidrofílica flanqueada por largas cadenas hidrofóbicas, en ocasiones terminadas nuevamente por grupos cargados, los cuales generalmente se conocen como bolanfifilos.³¹⁴ En esta línea, se diseñaron sistemas en los que la zona polar estaba compuesta por heptapéptidos ricos en glicina, los cuales están a menudo presentes en dominios transmembranales de proteínas transportadoras de cloruro. Al equipar estos sistemas con diferentes cadenas alquílicas de gran longitud y diferentes características, se pudo llevar a cabo un interesante estudio de estructura-actividad con estos sistemas anfífilicos transportadores de Cl^- .³¹⁵ Aparte de péptidos

³¹³ D. Montesarchio, C. Coppola, M. Boccalon, P. Tecilla, *Carbohydr. Res.* **2012**, 356, 62-74. C. Coppola, A. Paciello, G. Mangiapia, S. Licen, M. Boccalon, L. De Napoli, L. Paduano, P. Tecilla, D. Montesarchio, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 13757-13772. G. Di Fabio, A. Randazzo, J. D’Onofrio, C. Ausin, A. Grandas, E. Pedrosa, L. De Napoli, D. Montesarchio, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3395-3408.

³¹⁴ N. Nuraje, H. Bai, K. Su, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, 38, 302-343.

³¹⁵ P. H. Schlesinger, R. Ferdani, J. Liu, J. Pajewska, R. Pajewski, M. Saito, H. Shabany, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1848-1849. N. Djedovic, R. Ferdani, E. Harder, J. Pajewska, R. Pajewski, M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *New J. Chem.* **2005**, 29, 291-305. P. H. Schlesinger, N. K. Djedovic, R. Ferdani, J. Pajewska, R. Pajewski, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2003**, 308-309.

bioinspirados como base del diseño, se ha recurrido a la utilización del ácido cólico, un esteroide natural que presenta dos caras con diferencias notables de polaridad. En esta dirección, se han preparado dímeros de ácido cólico separados por diversos espaciadores, en los que la cara rica en hidroxilos lo convierte en un buen candidato para el transporte de cationes.³¹⁶ Utilizando esta estrategia, Kobuke y colaboradores demostraron la importancia que juega el grupo polar terminal en los bolanfilos basados en dímeros de ácido cólico (R en la Figura 47), ya que en ausencia de grupos cargados se perdía la selectividad catión/anión y K^+/Na^+ .³¹⁷ Finalmente se demostró, mediante un concepto bastante revolucionario, que la unión entre ambas unidades de ácido cólico no tenía por qué ser de naturaleza covalente, sino que se podía recurrir a la formación de enlaces de coordinación basados en complejos de Pd y piridina, los cuales demostraron tener una mejor eficiencia de transporte de K^+ y Na^+ que algunos ejemplos descritos previamente por Kobuke.³¹⁸

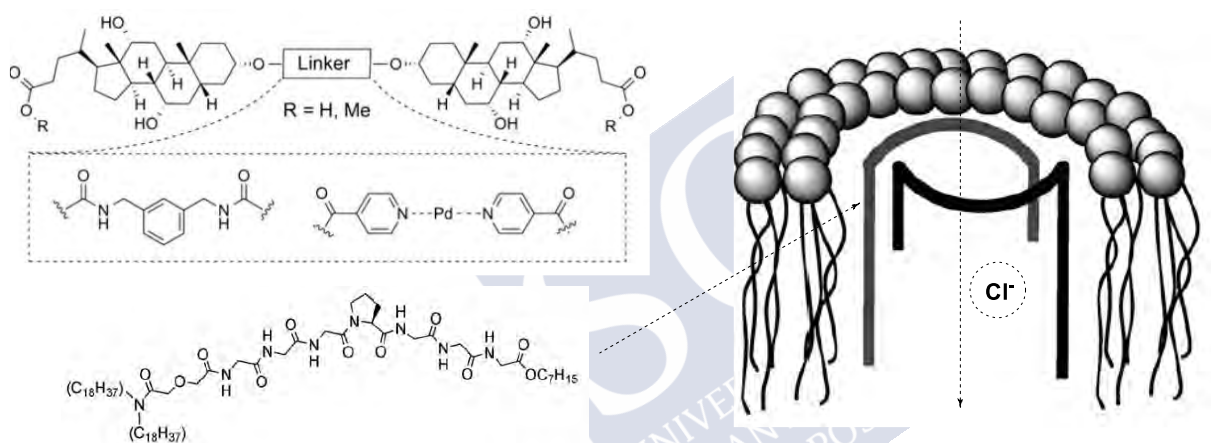


Figura 47. Dímeros de ácido cólico con diferentes espaciadores³¹⁷ y sistemas basados en heptapéptidos de poliglicina desarrollados por Gokel para el transporte de cloruro.³¹⁵

Modelos anfipáticos todavía más sencillos han sido explotados como *membrane spanners* por varios de los grupos de investigación que se han nombrado hasta ahora. De esta forma, Kobuke demostró la posibilidad de utilizar parejas de anfífilos con carga opuesta (amonios cuaternarios con dos colas y carboxilatos con una cola), de tal manera que su dimerización, favorecida por la formación de puentes salinos, generaba la especie transportadora capaz de migrar iones potasio de manera preferente sobre los cloruros.³¹⁹ Este diseño permitió ir un paso más allá en la funcionalidad de estos transportadores y se demostró que si se incorporaba una unidad azobencénica en una de las colas de la mitad amónica se podría modular la capacidad transportadora con la luz.

³¹⁶ F. De Riccardis, I. Izzo, D. Montesarchio, P. Tecilla, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2781-2790.

³¹⁷ Y. Kobuke, T. Nagatani, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5094-5101. M. Yoshii, M. Yamamura, A. Satake, Y. Kobuke, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2619-2623.

³¹⁸ C. P. Wilson, S. J. Webb, *Chem. Commun.* **2008**, 4007-4009.

³¹⁹ Y. Kobuke, A. Ohgoshi, *Colloids Surf. A* **2000**, 169, 187-197.

El grupo de Fyles desarrolló sistemas macrocíclicos derivados de ésteres del ácido málico, los cuales se unen entre sí a través de puentes disulfuro con una unidad central aromática.³²⁰ Este ejemplo demostró presentar características similares a los transportadores basados en varias unidades de éteres corona descritos previamente. El proceso de simplificación continuó tras este trabajo, y se pudo demostrar que compuestos lineales tan sencillos como oligoésteres que alternan secciones hidrofóbicas e hidrofílicas a lo largo de su extensa estructura también pueden ser utilizados para inducir permeabilidad membranar.³²¹ La aparición de múltiples estados conductores en su caracterización electrofisiológica sugiere nuevamente que estos oligoésteres se asocian para generar diversos tipos de agregados supramoleculares, los cuales son, en realidad, las especies que presentan capacidad transportadora propiamente dicha.³²²

Más recientemente se han utilizado grandes macrociclos (hasta 72 átomos) basados en la química *click*, que cuentan con un modelo de bolanfílo inverso en los cuales la parte interna es hidrofóbica y contiene dos fosfatos en extremos opuestos.³²³ Por último, destacar que ciertos fosfolípidos también pueden inducir permeabilidad en las membranas sin destruirlas completamente. Este proceso se basa en el uso de fosfolípidos compuestos por ácidos grasos de cadena más corta que los que contienen mayoritariamente las membranas a través de la cual se quieren transportar iones. El proceso que se induce en este caso es la formación de pequeños poros de tiempos de vida cortos (Figura 44, derecha) que derivan de las fluctuaciones en la fluidez de la membrana, ya que la temperatura de transición de fase de las membranas es dependiente de su composición lipídica.³²⁴

2.3. Ionóforos/*carriers*

A la hora de diseñar transportadores sintéticos que actuaran con un modo de acción tipo ionóforo, los químicos se han podido inspirar en las muchas moléculas aisladas de organismos vivos que presentaban actividad antimicrobiana. Estos antibióticos, cuya actividad deriva de su capacidad para desequilibrar el balance iónico de ciertos microorganismos, poseen notables selectividades a la hora de discernir entre un analito u otro.³²⁵ Repasando las estructuras de los ionóforos naturales, estos presentan a menudo un macrociclo rico en motivos hidrofóbicos en su periferia y dotado con grupos directores polares orientados hacia su cavidad.³²⁶ Existen muchos ejemplos de ionóforos no macrocíclicos, no obstante, estos pueden adquirir conformaciones que, en mayor o menor medida, secuestran a su ion correspondiente en una especie de bolsillo polar que esté protegido tridimensionalmente del interior hidrofóbico de la

³²⁰ T. M. Fyles, D. Looock, W. F. Van Straaten-Nijenhuis, X. Zhou, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8866-8874.

³²¹ T. M. Fyles, K. C. Kaye, T. D., James, D. W. M. Smiley, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1233-1236. T. M. Fyles, D. Looock, W. F. Van Straaten-Nijenhuis, X. Zhou, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8866-8874. T. Fyles, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2847-2855.

³²² T. M. Fyles, C. Hu, R. Knoy, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1335-1337. H. Luong, T. M. Fyles, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 725-732.

³²³ G. M. Mitchell, A. Hesketh, C. Lombardi, C. Ho, T. M. Fyles, *Can. J. Chem.* **2017**, *95*, 253 -262.

³²⁴ T. Heimberg, *Biophys. Chem.* **2010**, *150*, 2-22.

³²⁵ K. Neupertlaves, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 432-442.

³²⁶ J. Rotkowski, B. Brzezinski, *J. Biomed Res Int.* **2013**, 162513.

membrana, por lo que a efectos prácticos acaban comportándose prácticamente como una entidad cíclica cerrada.³²⁷

Como veremos a continuación, en el diseño *de novo* de estas sustancias es muy habitual que se recurra al uso de cavitandos funcionalizados, puesto que se les presupone ese confinamiento tridimensional deseado o, en su lugar, al uso de “moléculas molde” que cuenten con una cierta rigidez o estén prediseñadas para plegarse, de tal manera que definan algún tipo de cavidad susceptible de albergar iones tras la incorporación de grupos funcionales que dirijan esta interacción. Un factor muy importante a la hora de diseñar ionóforos sintéticos eficientes es el equilibrio entre la estabilidad cinética y la termodinámica de los complejos ionóforo-ion que se forman. De nada sirve generar una cavidad que compleje un analito con una constante de asociación altísima si, tras migrar a través de la membrana lipídica, este complejo no es capaz de desensamblarse haciendo efectivo el proceso de transporte. Por tanto, es preciso que las moléculas transportadoras sintéticas presenten un cierto componente dinámico en los complejos que forman para que, de esta manera, una única molécula de ionóforo pueda complejar y soltar múltiples analitos de manera eficiente durante su vida útil.

En función del tipo de ion que se pretenda transportar, las características de la cavidad serán diferentes. Así, a la hora de transportar iones metálicos, donde tradicionalmente los iones alcalinos y alcalinotérreos han sido objetivos habituales en base a su importancia biológica, se suele optar por cavidades altamente oxigenadas, generalmente ricas en grupos carbonilos, éter o carboxilos, de tal manera que la riqueza electrónica del átomo de oxígeno pueda llegar a formar una nueva esfera de coordinación alrededor del ion, reduciendo así la barrera energética que supone la pérdida de su esfera de hidratación.

En base a los estudios pioneros con éteres coronas y criptandos en el campo de la química supramolecular, las primeras aproximaciones sintéticas de ionóforos se inspiraron en estas estructuras. No obstante, se observó que en muchas ocasiones se producía una complejación demasiado fuerte en las cavidades de estos macrociclos como para poder liberar de manera eficiente el catión en el lado *trans*, por lo que su aplicación parecía incierta.³²⁸ Para solventar esta problemática, se plantearon varias alternativas: en primer lugar, frente al uso de criptandos tridimensionales cerrados se optó por la utilización de éteres corona que estuvieran dotados de un brazo lateral flexible con propiedades coordinantes.³²⁹ Esta estrategia se basaba en la incorporación de unidades de malonato en el anillo o la inclusión de uno o más átomos de nitrógeno que proyectasen dicha cadena flexible fuera del plano. Otra elegante aproximación ha consistido en la unión de dos éteres corona mediante un conector fotoisomerizable como el azobenceno, de tal manera que se puede modular la capacidad para entregar la carga iónica tras llevar a cabo el transporte al favorecer la separación del complejo sándwich mediante el cambio conformacional fotoinducido (Figura 48, derecha).³³⁰

No obstante, en ocasiones se observaba que el transporte de iones metálicos dependía enormemente del anión que los acompañase, puesto que se conocen muy pocos transportadores

³²⁷ E. M. Scholar, W. B. Pratt, *The Antimicrobial Drugs*, 2nd Edn., Oxford University Press, Oxford, **2000**.

³²⁸ E. Graft, J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5022-5024.

³²⁹ G. W. Gokel, K. A. Arnold, M. Delgado, L. Echeverría, V. J. Gatto, D. A. Gustowski, J. Hernandez, A. Kaifer, S. R. Miller, L. Echegoyen, *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 461-465.

³³⁰ M. Okahara, Y. Nakatsuji, *Topics in Current Chemistry: Biomimetic and Bioorganic Chemistry* **1985**, *128*, 37-59.

sintéticos *uniport* electrogénicos.³³¹ Por ello, en ocasiones se ha recurrido a la incorporación de grupos protonables en esas cadenas flexibles que comentábamos previamente, de tal manera que tras la complejación y migración transmembranal, un grupo carboxilato, por ejemplo, pueda protonarse para permitir a la especie transportadora retornar a la disolución inicial, lo que le convierte en un transportador *antiporter* tipo M^+/H^+ (Figura 48, derecha).³³²

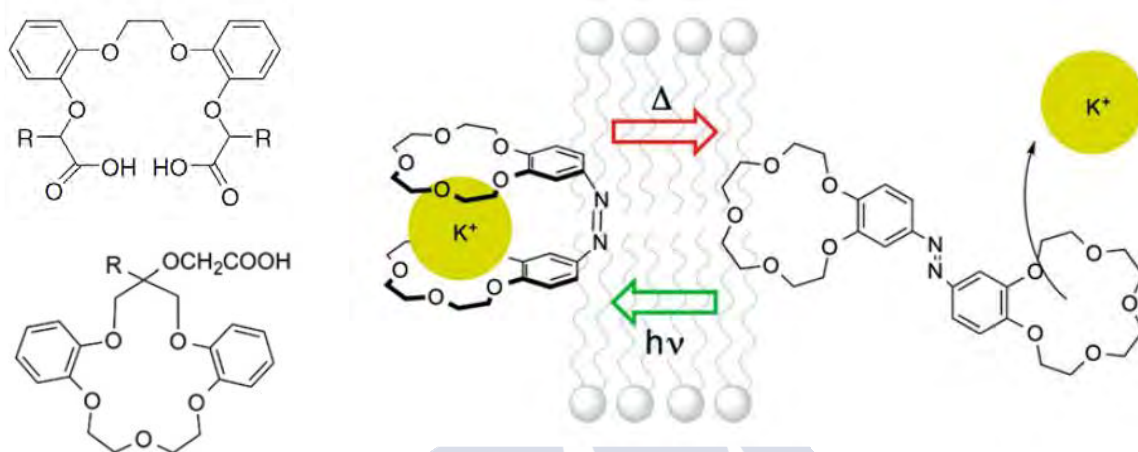


Figura 48. Izquierda: transportadores basados en éteres corona que explotan la estrategia de utilizar ácidos carboxílicos para llevar a cabo el proceso de *antiport* tipo M^+/H^+ , en el que el ejemplo inferior también presenta una cadena que lo convierte en un “criptando dinámico”.³²⁹ Derecha: sistema de transporte fotodinámico que explota la isomerización de azobenceno para la liberación de iones potasio.³³⁰

Usando una aproximación completamente diferente, diferentes calixarenos han servido como plataformas transportadoras desde que el primer ejemplo de un transportador selectivo para el ion sodio fuese descrito en el año 1996.³³³ En este caso, la capacidad inherente de estos cavitandos para establecer interacciones catión- π se ha podido reforzar mediante la incorporación de tapas basadas en cadenas de oligoetilenglicol que conectan anillos aromáticos no adyacentes del macrociclo (Figura 49). Con esta aproximación ha sido posible modular las propiedades transportadoras de estos sistemas mediante la variación de longitud de dicha tapa,³³⁴ los sustituyes del borde opuesto del macrociclo, el número de unidades de areno³³⁵ o la inclusión de grupos que modulen la conformación del macrociclo.³³⁶ Cabe destacar que algunos

³³¹ El transporte electrogénico se define como aquel que genera un potencial de membrana neto. Está presente en todos los procesos de naturaleza *uniport*, puesto que la carga que se mueve no se balancea ni con el tránsito de contraiones en la misma dirección (*symport*) ni con el transporte en sentido opuesto de iones de igual carga (*antiport*).

³³² W. Walkowiak, C. A. Kozłowski, *Desalination* **2009**, *240*, 186-197.

³³³ T. Jin, M. Kinjo, T. Koyama, Y. Kobayashi, H. Harita, *Langmuir* **1996**, *12*, 2684-2689.

³³⁴ P. M. Marcos, S. Félix, J. R. Ascenso, M. A. Santos, M. A. P. Segurado, J. L. C. Pereira, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9223-9230.

³³⁵ F. Arnaud-Neu, Z. Asfari, B. Souley, J. Vicens, P. Thuéry, M. Nierlich, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 495-499.

³³⁶ A. Casnati, A. Pochini, R. Ungaro, F. Ugozzoli, F. Arnaud, S. Fanni, M. J. Schwing, R. J. M. Egberink, F. de Jong, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2767-2777.

autores han combinado más de una unidad de calixareno a través de su plano vertical para dar lugar a estructuras tubulares que no son lo suficientemente largas para extenderse por toda la membrana y formar un canal permanente, por lo que actúan mediante un mecanismo de ionóforo (Figura 49, derecha).³³⁷

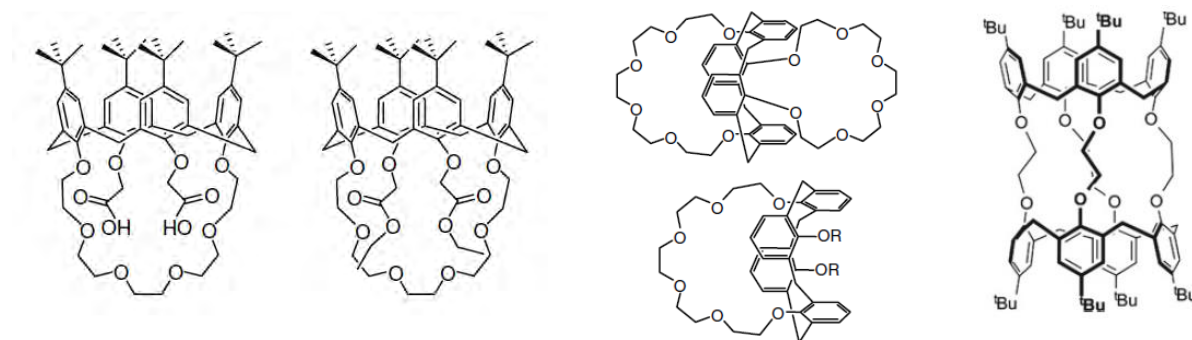


Figura 49. Sistemas ionofóricos para el transporte de iones alcalinos y alcalinotérreos basados en un esqueleto de calix[4]areno que incorporan regiones poli-oxigenadas.³³³⁻³³⁷

El terreno del transporte de aniones ha sido posiblemente todavía más estudiado que el de las especies cargadas positivamente. En este aspecto, la estrategia general consiste en dotar al sitio de complejación de grupos que contengan dadores de enlace de hidrógeno o incluso de anillos aromáticos pobres en electrones, que puedan interaccionar con los aniones de interés a través de contactos anión- π . A la hora de diseñar anionóforos, muchos grupos han centrado su atención en la modificación de moléculas naturales cuya eficiencia era conocida previamente. Un ejemplo claro es el caso de las prodigininas³³⁸ y las tambjaminas,³³⁹ que son familias de moléculas basadas en un esqueleto de 4-metoxi-bipirrol que está sustituido por alquilpirroles o enaminas apolares, respectivamente (Figura 50). Este tipo de moléculas ha sido estudiado por grupos como el de Sessler,³⁴⁰ Gale³⁴¹ o Quesada,³⁴² quienes han demostrado en la última década, mediante abundantes estudios de estructura-actividad, la habilidad de estas moléculas semisintéticas para funcionar como cotransportadores de HCl ³⁴³ o de intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.³⁴⁴

Otros esqueletos más simples que las prodigininas han sido utilizados para preparar de manera sintética transportadores eficientes. La estrategia reside en la utilización de un anillo

³³⁷ P. Schmitt, P. D. Beer, M. G. B. Drew, P. D. Sheen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1840-1842.

³³⁸ A. Furstner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3582-3603.

³³⁹ B. Carte, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2314-2318.

³⁴⁰ J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5989-5992.

³⁴¹ L. A. Jowett, E. N. W. Howe, V. Soto-Cerrato, W. V. Rossom, R. Pérez-Tomás, P. A. Gale, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 9397.

³⁴² V. Saggiomo, S. Otto, I. Marques, V. Félix, T. Torroba, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5274-5276.

³⁴³ K. Tanigaki, T. Sato, Y. Tanaka, T. Ochi, A. Nishikawa, K. Nagai, H. Kawashima, S. Ohkuma, *FEBS Lett.* **2002**, *524*, 37-42.

³⁴⁴ J. T. Davis, P. A. Gale, O. A. Okunola, P. Prados, J. C. Iglesias-Sánchez, T. Torroba, R. Quesada, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 138-144.

central (normalmente aromático) que se utiliza como núcleo rígido para dirigir la incorporación de grupos funcionales ricos en grupos NH dadores de enlace de hidrógeno. Ejemplos de esta estrategia son las escuaramidas,³⁴⁵ las isoftalamidas³⁴⁶ o las *orto*-fenilendiureas³⁴⁷. Todas estas unidades centrales se pueden utilizar para obtener multitud de derivados de manera sintéticamente muy sencilla.

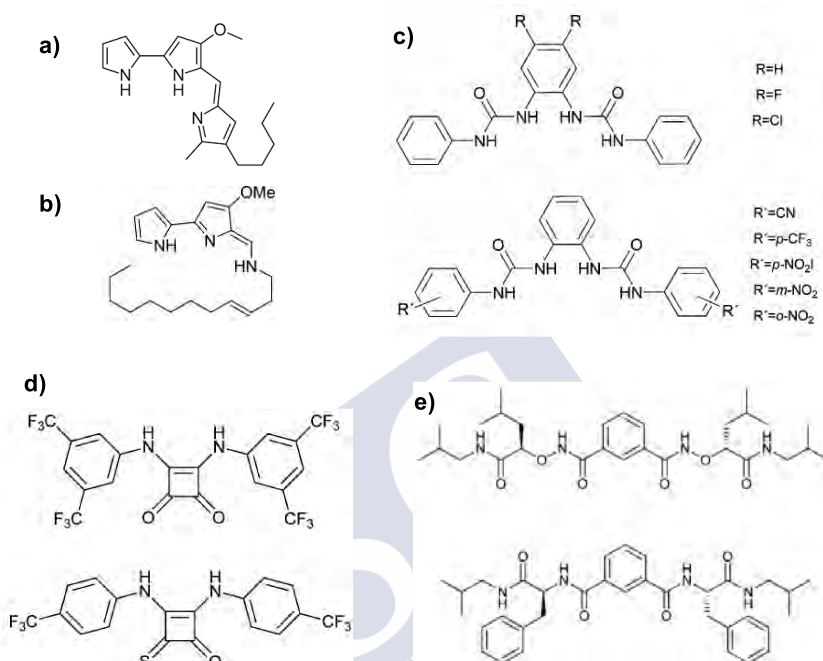


Figura 50. a) Prodigiosina, b) tambjamina, c) *ortho*-fenilendiureas, d) escuaramidas y e) isoftalamidas que funcionan como ionóforos de aniones.³³⁸⁻³⁴⁷

Así, la incorporación de otros anillos aromáticos adicionales en los extremos con diferentes propiedades electrónicas ha servido para enmascarar la hidrofilia de los aniones durante el proceso de transporte. Por ejemplo, escuaramidas que incorporan dos unidades aromáticas con sustituyentes CF₃ en las posiciones 3 y 5 demostraron una gran efectividad como *antiporters* Cl⁻/NO₃⁻, manteniendo su actividad a concentraciones bajas, tal como 1% con respecto al lípido que forma las membranas. Yang y colaboradores han desarrollado isoftalamidas de bajo peso molecular decoradas con dipéptidos hidrofóbicos que exhibieron selectividades del tipo NO₃⁻>I⁻>Br⁻>Cl⁻>F⁻ en experimentos de *patch-clamp*.³⁴⁸ En cuanto a las *ortho*-fenilendiureas, la incorporación de anillos aromáticos pobres en electrones (grupos nitro,

³⁴⁵ N. Busschaert, I. L. Kirby, S. Young, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426-4430.

³⁴⁶ C. R. Yamnitz, S. Negin, I. A. Carasel, R. K. Winter, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2838-2840.

³⁴⁷ S. J. Moore, C. J. E. Haynes, J. González, J. L. Sutton, S. J. Brooks, M. E. Light, J. Herniman, G. J. Langley, V. Soto-Cerrato, R. Pérez-Tomás, I. Marques, P. J. Costa, V. Félix, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 103-117. C. M. Días, H. Li, H. Valkenier, L. E. Karagiannidis, P. A. Gale, D. N. Sheppard, A. P. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1083-1087.

³⁴⁸ B. Shen, X. Li, F. Wang, X. Yao, D. Yang, *PLoS One* **2012**, *7*, e34694. P.-Y. Liu, S.-T. Li, F.-F. Shen, W.-H. Ko, X.-Q. Yao, D. Yang, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7380-7383.

nitrilo o trifluorometilo) dio lugar a interesantes *antiporters* de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, de los que alguno incluso ha sido estudiado como potencial agente anticáncer.³⁴⁹

Refinando la estrategia descrita en los anteriores párrafos, se ha tratado de extender la cobertura del anión de un modo más tridimensional, para que, tras la formación del complejo anión-transportador, la lipofilia global sea óptima. Para lograr dicho confinamiento tridimensional, se han desarrollado estructuras basadas en núcleos que de por sí posean una cierta predisposición conformacional previa que facilite la disposición espacial de los grupos coordinantes. Este es el caso de ciertos esqueletos esteroideos basados en el ácido cólico desarrollados en el grupo de Anthony P. Davis, que fueron bautizados como *cholapods* (Figura 51, parte superior izquierda).³⁵⁰ Esta aproximación se basa en explotar la naturaleza hidrofóbica de una de las caras de dicho esteroide mientras que la presencia de grupos modificables en las posiciones 3, 7 y 12 del esqueleto policíclico permite la incorporación de unidades complejantes de aniones como aril-ureas, tioureas, amidas o escuaramidas, entre otros. Todas estas características dotan a estos sistemas de una preorganización muy interesante, además de ofrecer un gran abanico de posibilidades para experimentar con el efecto que tienen las modificaciones químicas en las posiciones previamente comentadas. Siguiendo esta línea, los autores han encontrado candidatos que presentan actividades de transporte de Cl^- usando relaciones transportador:lípido ínfimas, por debajo de 1:500000 cuando preincuban las vesículas modelo con los *cholapods*. Hay que destacar que en estas situaciones el promedio de ionóforo por vesícula es inferior a 1, lo que da una idea de su potencia.³⁵¹

Un efecto similar al de los esteroides policíclicos se ha conseguido mediante el uso de esqueletos más sencillos como las *trans*-decalinas con sustitución 1,5-diaxial,³⁵² o, incluso, más recientemente, el uso de unidades de antraceno sustituido en las posiciones 1 y 8.³⁵³ Con todos estos esqueletos se consigue una preorganización tridimensional óptima, y es que se mantiene una de las caras intacta con propiedades hidrofóbicas mientras que la cara opuesta se funcionaliza con dos unidades de grupos urea o tiourea que incorporan sustituyentes aromáticos para controlar de manera precisa la acidez de los grupos NHs involucrados en la interacción con el anión. En este aspecto cabe destacar la facilidad con la que los autores pueden preparar enormes quimiotecas a partir de cortas rutas sintéticas, lo que ha llevado al descubrimiento de un compuesto que realiza el transporte más efectivo conocido hasta la fecha (en términos cinéticos) para el ion cloruro. Concretamente se trata de un derivado de la *trans*-decalina que incorpora dos unidades de aril-tioureas en los que los anillos aromáticos incorporan dos grupos CF_3 en las posiciones 3 y 5 (Figura 51, abajo a la derecha). Esta molécula demostró ser capaz de “apagar” una sonda intravesicular sensible a iones cloruro con una constante de velocidad inicial de 850 iones cloruro por segundo cuando se preincuban las vesículas con tan solo 1 molécula de transportador por cada 250000 moléculas de lípido, lo que supone una actividad similar a la proteína natural encargada del transporte de cloruro.³⁵⁴

³⁴⁹ P. Gale, J. Davis, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 2497-2519.

³⁵⁰ P. R. Brotherhood, A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3633-3647.

³⁵¹ S. J. Edwards, H. Valkenier, N. Busschaert, P. A. Gale, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 4592-4596.

³⁵² S. Hussain, P. R. Brotherhood, L. W. Judd, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 1614-1617.

³⁵³ C. Dias, H. Valkenier, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 6262-6268.

³⁵⁴ H. Valkenier, L. W. Judd, H. Li, S. Hussain, D. N. Sheppard, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 12507-12512.

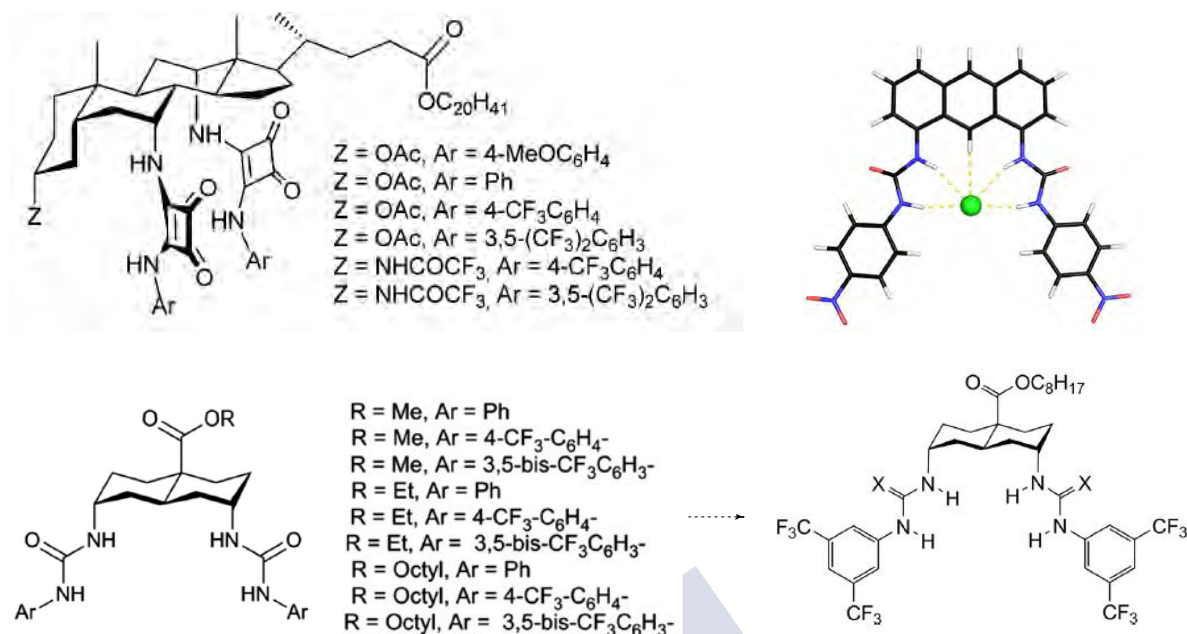


Figura 51. En la parte superior se muestra la estructura de los conocidos como *cholapods* (izquierda), donde el esqueleto de escuaramida en ocasiones se sustituye por anillos aromáticos pobres en electrones. A la derecha se muestra el transportador basado en una unidad de *bis*-ureidoantraceno, donde se indica su interacción con el ion Cl^- . En la parte inferior se pueden observar algunas de las *trans*-decalinas más representativas, mostrando en la parte derecha el compuesto más eficiente hasta la fecha ($X=\text{S}$).³⁴⁷⁻³⁵¹

Finalmente, se han empleado núcleos de simetría C_3 para el desarrollo de moléculas de tipo tripodal, que llevan el confinamiento un paso más allá con respecto a las plataformas *bis*-sustituídas del párrafo anterior. En esta línea se ha empleado la *tris*(2-aminoetil)amina (tren) para la incorporación de tres ureas o tioureas, las cuales presentan importantes propiedades como transportadores de bicarbonato,³⁵⁵ e incluso han sido estudiadas como agentes anticancerosos frente a varias líneas celulares tumorales.³⁴⁹ Esta estrategia se ha utilizado recientemente para analizar cómo afecta la incorporación de cadenas alquílicas fluoradas a las capacidades transportadoras de este tipo de ionóforos.³⁵⁶ También han encontrado cabida los ciclohexanos trisustituídos en posiciones no adyacentes,³⁵⁷ en los cuales se puede realizar una ligera modificación que consiste en añadir dos grupos metilo geminales en el metileno cercano al anillo para forzar su disposición correcta (Figura 52). Esta estrategia se ha extendido al uso de plataformas como derivados de 2,4,6-trietilbenceno, de tal forma que los sustituyentes en las posiciones 1, 3 y 5 queden hacia la misma cara. Estos derivados han sido decorados con los típicos grupos arilo pobres en electrones (sustitución de protones aromáticos por átomos de flúor o grupos trifluorometilo)³⁵⁸ o con grupos diaminocolilo, que a su vez también presentan

³⁵⁵ N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell Jr., *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6252-6254.

³⁴⁹ P. Gale, J. Davis, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 2497-2519.

³⁵⁶ M. J. Spooner, H. Li, I. Marques, P. M. R. Costa, X. Wu, E. N. W. Howe, N. Busschaert, S. K. Moore, M. E. Light, D. N. Sheppard, V. Félix, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2019**, 10, 1976-1985.

³⁵⁷ J. A. Cooper, S. T. G. Street, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 5609-5613.

³⁵⁸ H. Valkenier, C. M. Dias, K. L. Porter-Goff, O. Jurcek, R. Puttreddy, K. Rissanen, A. P. Davies, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 14235-14238.

dos caras con propiedades muy diferentes y que han demostrado actividad en el transporte de aniones no muy habituales, como el ion perclorato.³⁵⁹ El policiclo derivado de la benzoxacina también ha sido estudiado para la preparación de un ionóforo con paredes aromáticas extendidas, en donde se demostró que la incorporación de ureas es más efectiva para transportar cloruros que la presencia de amidas (Figura 52, derecha).³⁶⁰

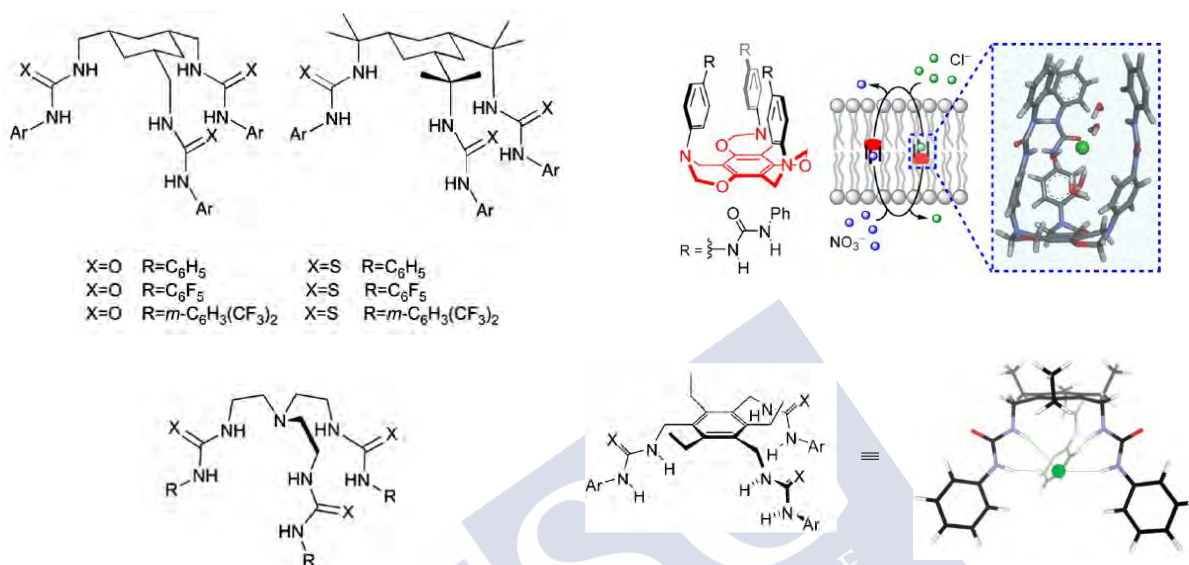


Figura 52. Aproximaciones tripodales para la síntesis de transportadores de Cl⁻, en los que se explota la preorganización topológica de un esqueleto central tri-sustituido.³⁵⁷⁻³⁶⁰

Volviendo al uso de los cavitandos para diseñar ionóforos selectivos, los calixpirroles han sido ampliamente explotados en el campo del transporte de aniones. Su atractivo se basa en la presencia de varios grupos NH de pirrol dirigidos hacia la misma región espacial de la cavidad, lo que sumado a la posibilidad de modificar fácilmente su esqueleto los convierte en candidatos versátiles para el diseño de transportadores a la carta.³⁶¹ Los primeros estudios en este campo descubrieron que el *meso*-octametilcalix[4]pirrol funciona como un *symporter* de CsCl excelente,³⁶² donde la complejación se basa en la interacción del anión con los grupos NH mientras que el catión cesio se localiza en el cono aromático formando un par iónico similar a otras especies que habían sido descritas previamente con cationes grandes y con cargas deslocalizadas.³⁶³ Sin embargo, se demostró que la sustitución de los protones β de las unidades pirrónicas por átomos de flúor modificaban este comportamiento, de tal manera que este cavitando se pasaba a comportar como un *antiport* Cl⁻/NO₃⁻ o Cl⁻/HCO₃⁻, evidenciando la versatilidad de estas plataformas. Además, ha sido posible modificar las propiedades transportadoras mediante la incorporación de varios tipos de cadenas que actúen como “tapas”

³⁵⁹ Z. Li, X.-H. Yu, D.-Q. Yuan, W.-H. Chen, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13368-13375.

³⁶⁰ A. Roy, D. Saha, A. Mukherjee, P. Talukdar, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5864-5867.

³⁶¹ D. S. Kim, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 532-546.

³⁶² C. C. Tong, R. Quesada, J. L. Sessler, P. A. Gale, *Chem. Commun.* **2008**, 6321-6323.

³⁶³ R. Custelcean, L. H. Delmau, B. A. Moyer, J. L. Sessler, W.-S. Cho, D. E. Gross, G. W. Bates, S. J. Brooks, M. E. Light, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2537-2542.

del cavitando, al igual que vimos con los calixarenos transportadores de cationes. De este modo, la incorporación de una o dos unidades de triazol en esta tapa supuso una mejora notable en la capacidad de transporte del Cl^- ,³⁶⁴ mientras que la incorporación de cadenas de oligoetilenglicol se ha utilizado para demostrar que, en función del catión metálico presente, se pueden formar complejos estables con el cono aromático de los pirroles (por ejemplo, con Cs^+) o pares iónicos estables en los que cationes más pequeños ocupan las cadenas polioxigenadas (en el caso de Na^+ o Li^+). Finalmente, el grupo de Ballester ha llevado a cabo un detallado estudio con calixpirroles que presentan paredes aromáticas pobres en electrones en posiciones *meso* alternadas, en los que se demuestra la complejación y el transporte selectivo de iones nitrato frente a otros aniones relevantes.³⁶⁵

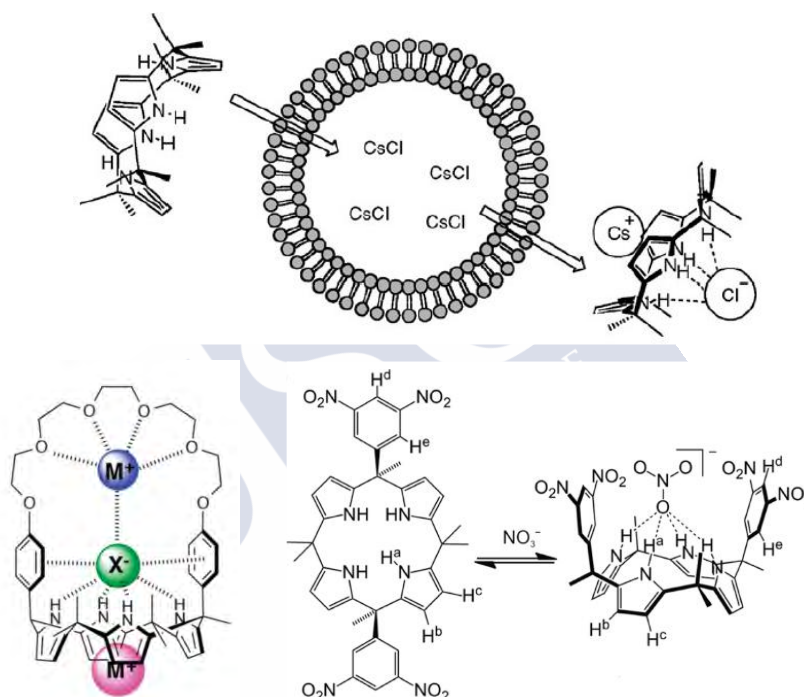


Figura 53. Utilización de cavitandos calixpirrólicos como anionóforos versátiles, donde permiten la modificación de sus posiciones tanto *meso* como β .³⁶¹⁻³⁶⁵

Tras este breve repaso bibliográfico, podemos concluir que el diseño de nuevos transportadores transmembranales es un campo relativamente joven, en el cual todavía se está llevando a cabo una importante labor de refinamiento de las estructuras. Además, a pesar de que el salto al campo biológico para intentar paliar los problemas derivados de las anteriormente citadas canalopatías está dando sus primeros frutos,³⁶⁶ todavía se encuentra en una fase de

³⁶⁴ C.-H. Lee, H.-K. Na, D.-W. Yoon, D.-H. Won, W.-S. Cho, V. M. Lynch, S. V. Shevchuk, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7301-7306.

³⁶⁵ L. Adriaenssens, C. Estarellas, A. V. Jentzsch, M. M. Belmonte, S. Matile, P. Ballester, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8324-8330.

³⁶⁶ K. A. Muraglia, R. S. Chorghade, B. R. Kim, X. X. Tang, V. S. Shah, A. S. Grillo, P. N. Daniels, A. G. Cioffi, P. H. Karp, L. Zhu, M. J. Welsh, M. D. Burke, *Nature* **2019**, *567*, 405-408.

desarrollo muy temprana.³⁴⁹ Es por ello que existe un gran interés en el desarrollo de nuevas moléculas transportadoras que desempeñen su función de manera eficiente.



³⁴⁹ P. A. Gale, J. T. Davis, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2497-2519.

Objetivos





Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en el diseño, síntesis y estudio de nuevos sistemas supramoleculares funcionales basados en dímeros de α,γ -ciclopéptidos. En vista de todos los antecedentes descritos previamente en la introducción de esta memoria, pensamos que estos macrociclos poseen una serie de características estructurales que los convierte en plataformas muy versátiles para la preparación de supramoléculas con aplicaciones en diversas áreas de relevancia, gracias a que se apilan mediante la formación de múltiples enlaces de hidrógeno formando sistemas diméricos estables.

Concretamente, nos proponemos explorar la estrategia desarrollada recientemente en el grupo de investigación que consiste en el bloqueo de una de las caras del dímero mediante la incorporación de cadenas alquílicas funcionales en lugar de los tradicionales grupos metílicos. Para ello, durante la síntesis peptídica se llevará a cabo la incorporación de diferentes cadenas sobre el átomo de nitrógeno del ácido 3-aminociclopentanocarboxílico (γ -Acp). Esta alquilación se puede realizar en condiciones suaves si se emplea un grupo protector temporal fuertemente atractor de electrones sobre el grupo amina, tal como el 2-nitrobenzenosulfonilo (Figura 54). Este grupo disminuye el pKa del protón amínico y facilita que se pueda llevar a cabo la incorporación de virtualmente cualquier cadena alquílica en condiciones básicas suaves. Esta estrategia resuelve una de las grandes limitaciones en las alquilaciones realizadas con grupos menos electroattractores; la epimerización observada en el C α del Acp.

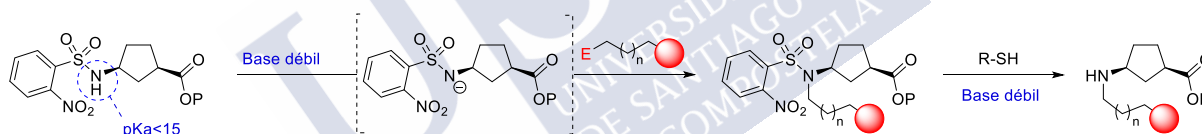


Figura 54. Estrategia de Fukuyama para la mono-alquilación de aminas, que en nuestro caso se aprovechará para dotar a los γ -Aa de grupos funcionales (esfera roja).

Con estas premisas, el primer objetivo concreto consistirá en la preparación de una nueva clase de nanotubos que permitan ejercer un control sobre los parámetros que guían su ensamblaje, pudiéndose modificar propiedades del agregado final como la longitud. Para llevar a cabo este proceso, recurriremos a las diferencias existentes entre las constantes de dimerización (K_a) de péptidos cíclicos de diferentes tamaños. Como se ha visto en la Introducción, este parámetro depende del tipo de Aas que interaccionan y, sobre todo, del número de enlaces de hidrógeno que se forman, lo cual viene determinado por el número de Aas que conforman el péptido. Para alcanzar este objetivo, nos proponemos unir covalentemente un octapéptido y un tetrapéptido a través de las cadenas incorporadas en los grupos amino de dos Acps de ambos ciclos, de tal forma que estos grupos queden orientados paralelamente (verticalmente) al eje de simetría de los péptidos. Para dicha unión optamos por la química *click*, basada en la cicloadición 2+3 catalizada por cobre entre una azida y un alquino. De esta forma, se obtendría un sistema *bis*-ciclopeptídico con forma cónico-truncada en el que las propiedades de autoensamblaje (K_a de dimerización) de cada cara fuesen diferentes. Los modelos diméricos estudiados con anterioridad varían entre los 10^2 M^{-1} para los tetrapéptidos

cíclicos y mayores de 10^5 M^{-1} para los octámeros. En base a estas diferencias de asociación, esperábamos que el empleo de diferentes disolventes se pudiese emplear para modular el proceso de autoensamblaje y, por ende, la longitud de los nanotubos. Por ejemplo, el empleo de disolventes orgánicos poco polares como el CH_2Cl_2 o el CHCl_3 , daría lugar a un crecimiento poco controlado del nanotubo y por tanto a la formación de agregados supramoleculares de gran longitud, puesto que en estas condiciones la dimerización tendría lugar por ambos extremos del sistema *bis*-ciclo péptido. No obstante, es de esperar que, dada la baja K_a del tetrapéptido cíclico, el equilibrio podría restringirse a la formación de agregados de menor tamaño al aumentar la temperatura o disminuir la concentración de la muestra. Adicionalmente, se podría bloquear el crecimiento de este nanotubo con diámetro alternante mediante la adición de un disolvente que compita por los enlaces de hidrógeno, lo que ocurrirá preferentemente por el extremo estrecho dada su menor constante de asociación. De esta forma se podría restringir el proceso a la formación de nanotubos formados únicamente por cuatro discos peptídicos apilados. Adicionalmente, se podría introducir en el sistema un segundo péptido basado en el γ -Aa Ach, capaz de formar heterodímeros más estables que los correspondientes homodímeros, para que impida el crecimiento del nanotubo. Gracias a la formación de estos heterodímeros, se podría formar nanotubos constituidos por seis unidades peptídicas apiladas.

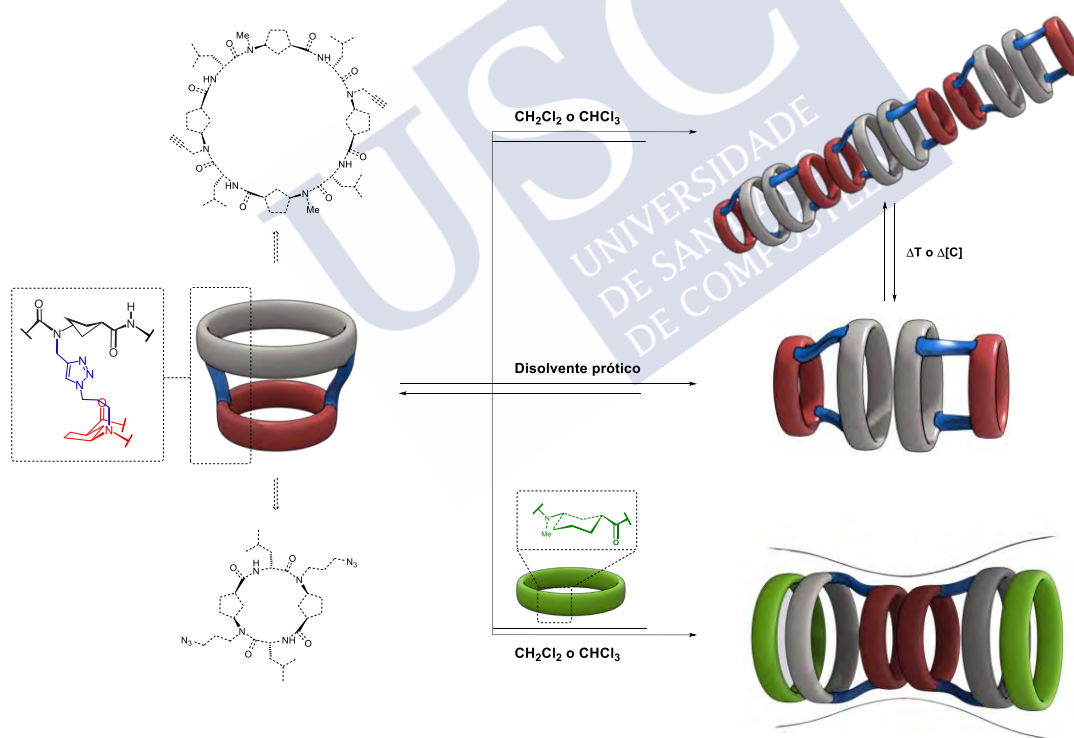


Figura 55. Diferentes especies nanotubulares (derecha) que se pretenden obtener mediante el uso del sistema *bis*-ciclo péptido (izquierda).

En el siguiente objetivo de ese trabajo de tesis pretendíamos extender la aplicación del sistema de funcionalización de la boca de entrada en los dímeros de α,γ -CPs hacia la preparación de transportadores transmembranales. Puesto que existen diversos factores que se

pueden adaptar en las estructuras de estos anillos, planteamos la síntesis de diferentes CPs con sus esqueletos peptídicos *N*-funcionalizados que presenten propiedades externas hidrofóbicas para favorecer su incorporación en el entorno apolar de las membranas. Estos sustituyentes del esqueleto se seleccionarían con la idea de que permitan realizar modificaciones post-sintéticas para incorporar otros grupos funcionales en las entradas a la cavidad interior del dímero, de tal forma que puedan complejar analitos de relevancia. En este aspecto nuestro objetivo residirá en la evaluación de la capacidad de estas moléculas artificiales para favorecer la migración a través de las bicapas lipídicas de iones de relevancia biológica. Concretamente, se pretende construir péptidos cíclicos transportadores basados en el modelo de *membrane spanner* (ver Sección 2.2 de la Introducción). Para ello se propone la incorporación de cadenas ricas en grupos etilenglicol que presenten grupos catiónicos en su extremo utilizando la estrategia tipo *click* descrita previamente (Figura 56, derecha). Este modelo permite evaluar el efecto que la longitud y la polaridad de las cadenas incorporadas tiene sobre el transporte (eficiencia, selectividad, etc.), lo que proporcionará una mejor comprensión sobre los factores que influyen en el proceso. Además de hacer reaccionar los grupos reactivos colocados en la boca del dímero con cadenas lineales de diferentes longitudes, también pretendemos estudiar otros grupos directores con mejores propiedades para coordinarse con iones metálicos, como los anillos de piridina. Con esta modificación, la incorporación de grupos coordinantes en el transportador presentaría una morfología más parecida a una cápsula si dichos grupos se cerrasen con la incorporación de un metal, que se podría comportar como un ionóforo en el que las tapas de piridina actuarían como grupos directores de la interacción con los iones (Figura 56, izquierda).

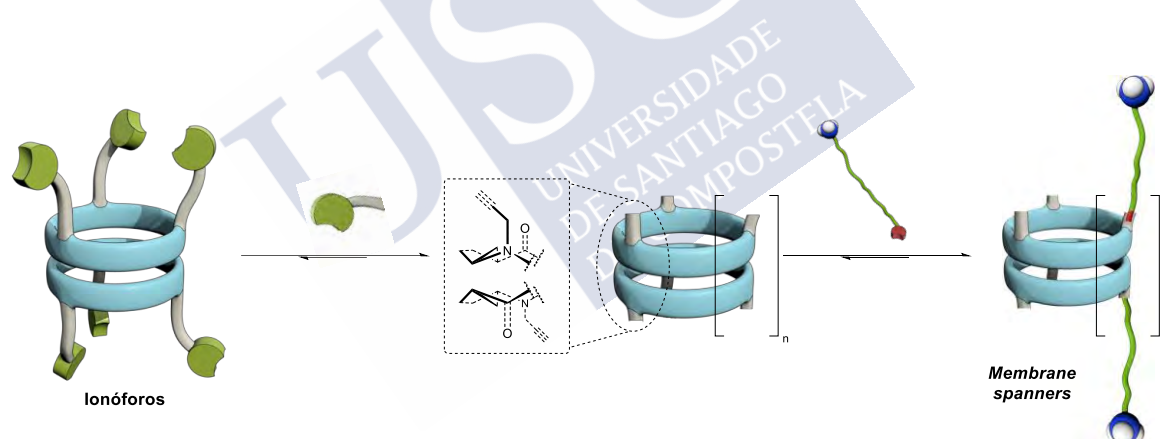


Figura 56. Síntesis de diferentes tipos de transportadores de membrana basados en dímeros ciclopeptídicos de propiedades modulables.

Como continuación a la segunda aproximación del proyecto de transporte, consideramos que el siguiente objetivo natural es la evaluación de estas cápsulas dotadas con piridinas para funcionar como contenedores moleculares de moléculas bifuncionales. Tal como se comentó anteriormente, la presencia de tres grupos piridina estratégicamente colocados en cada una de las bocas de la cavidad del dímero y a una distancia adecuada para interaccionar mediante enlaces de coordinación con un metal o mediante interacciones débiles con otro tipo de sustratos podrían cerrar la cavidad atrapando en su interior moléculas con forma y grupos funcionales complementarios a los de la capsula. En primer lugar, se propone la utilización de las piridinas para intentar la coordinación con metales de transición sobre la cavidad ciclopeptídica. De esta

manera, si se escogen metales de geometría apropiada (tetraédrica en este caso), se podría dirigir la encapsulación de moléculas que actúen como ligandos bidentados, conectando ambos metales a través de las posiciones de coordinación vacantes situados en las bocas de entradas del dímero. El objetivo en este aspecto sería demostrar la capacidad de este sistema para coordinar iones de cobre tetraédricos y explotar la cuarta posición de coordinación para alojar ligandos tipo bisnitrilo en la cavidad del dímero ciclopeptídico (Figura 57, derecha). Adicionalmente, este híbrido de péptido y piridinas podría actuar por sí mismo (sin necesidad de añadir un centro metálico) como contenedor de ligandos que poseyesen en sus extremos grupos ricos en dadores de enlace de hidrógeno como los grupos amonio, que son conocidos por formar pares iónicos con las piridinas mediante interacciones ácido-base (Figura 57, izquierda). Concretamente, llevaremos a cabo un estudio con varios ligandos diamónicos lineales de diferentes longitudes para estudiar el efecto que tiene este parámetro en la eficiencia de encapsulación. Esperamos que, si la longitud del guest es coincidente con la distancia entre las tapas piridínicas del dímero, el efecto quelato favorezca la interacción. Sin embargo, si las longitudes que separan a los dos grupos amonio difieren de la distancia adecuada para que se establezcan las interacciones con los dos grupos tripiridínicos simultáneamente, se formarían complejos con una menor estabilidad. Esta falta de complementariedad entre grupos de reconocimiento y longitudes podría dar lugar a la formación de entramados supramoleculares más complejos derivados de interacciones fuera de la cavidad.

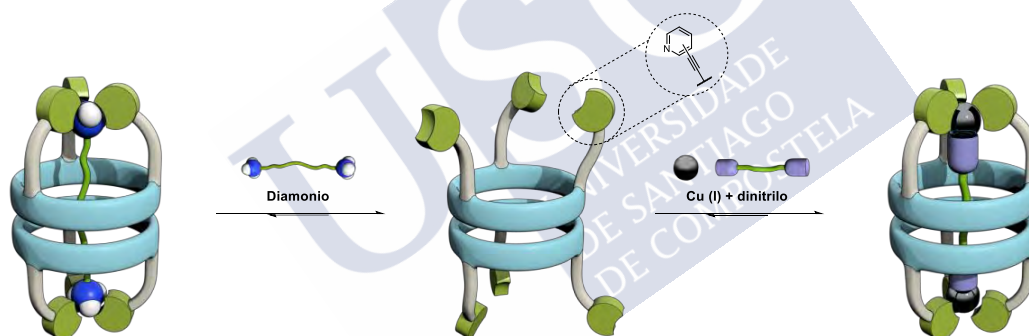


Figura 57. Estrategia versátil para la preparación de cápsulas para moléculas bifuncionales basadas en dímeros ciclopeptídicos funcionalizados con piridinas en sus extremos.

Por último, también nos propusimos extender esta metodología de preparación de cápsulas a sistemas con una mayor cavidad interna tal como los derivados de octapéptidos *N*-funcionalizados. Además, para restringir la movilidad de los grupos que actúan como tapa del dímero, se planteó la utilización de un sistema más rígido y cerrado, que propicie un menor número de grados de libertad en la formación de las especies encapsuladas. Para ello se emplearán macrociclos como las metaloporfirinas, con las que, además, se podría explotar la presencia de un metal en la parte central de la tapa para dirigir la encapsulación de aquellos ligandos que tengan afinidad por el centro metálico. Estas propiedades de encapsulación ya se habían demostrado anteriormente en el grupo de investigación. Para este proyecto nos planteamos que las propiedades modulares empleadas en la construcción de las cápsulas podrían ser empleadas para el reconocimiento de ligandos con dos grupos funcionales diferentes. Para ello, a partir de un único esqueleto peptídico se pueden preparar diferentes

hemicápsulas que contengan centros metálicos diferentes. Así, al combinar estas hemicápsulas se producirían mezclas complejas derivadas de la dimerización aleatoria de todas ellas. Sin embargo, nuestro objetivo es demostrar que, si se sintetizan ligandos que presenten dos grupos funcionales diferentes en sus extremos, puede ser posible desplazar el equilibrio hacia la formación de los complejos de inclusión formados por dos hemicápsulas diferentes en las que cada tapa interaccione con el grupo funcional con el que tiene afinidad su metal, exclusivamente. De esta forma se produciría una auto-selección o *self-sorting* inducida por la encapsulación del ligando. En esta línea, se amplificaría la presencia de los heterodímeros frente a los homodímeros con el empleo ligandos heterodifuncionales (Figura 58), mientras que empleando ligandos homobifuncionales se favorecería la formación de los homodímeros. Para llevar a cabo esta evaluación sintetizaremos una biblioteca de ligandos con diferentes grupos funcionales y longitudes para, posteriormente, evaluar su inclusión en los sistemas diméricos mediante diferentes técnicas espectroscópicas.

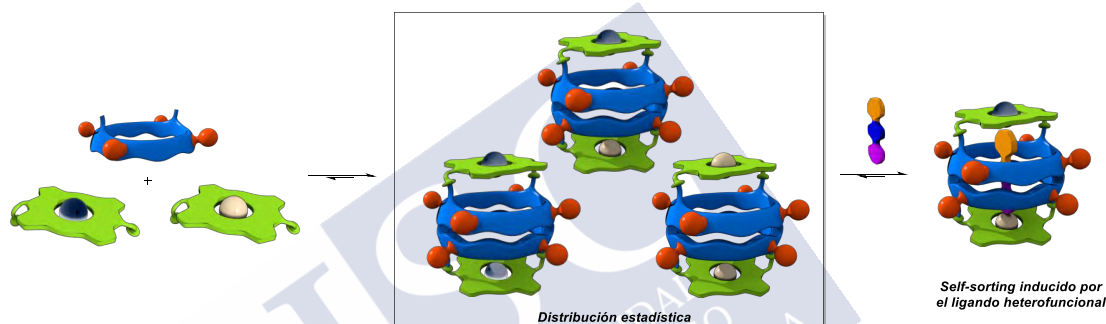


Figura 58. Propuesta de encapsulación dinámica de ligandos heterodifuncionales mediante cápsulas construidas a partir de diferentes dímeros ciclopeptídicos equipados con tapas metaloporfirínicas.



Capítulo I

Nanotubos autoensamblados tipo Venturi





Capítulo I: Nanotubos autoensamblados tipo Venturi

Como se ha comentado en la Introducción, la síntesis de nuevos nanotubos de dimensiones definidas constituye uno de los mayores desafíos para la nanotecnología.¹⁷ En esta línea, el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la obtención de estructuras tubulares huecas de dimensiones nanométricas es, todavía, uno de los objetivos recurrentes para los químicos supramoleculares, quienes aspiran a poder desarrollar aproximaciones puramente sintéticas con propiedades y dimensiones como diámetro (tanto de la cavidad como externo) y longitud definidas.²⁰⁴⁻²²² Anteriormente se ha descrito cómo el apilamiento de moléculas con forma de anillo que presentan una conformación plana, como los péptidos cíclicos,²²⁵ permiten un control preciso y modulable sobre el diámetro interno de los nanotubos que definen tras apilarse. Sin embargo, estas aproximaciones no presentan la misma eficiencia a la hora de poder controlar su grado de crecimiento longitudinal. Es precisamente el apilamiento longitudinal descontrolado de estos nanotubos peptídicos, que generalmente termina con la precipitación de los nanotubos, lo que retrasó su resolución estructural a nivel atómico mediante difracción de rayos X en la década de los 90.²³⁰

Uno de los únicos métodos que ha intentado paliar este crecimiento descontrolado de los nanotubos es la conjugación con diferentes cadenas poliméricas sobre las cadenas laterales de los CPs. Esta metodología, desarrollada principalmente por los grupos de Bielsalski y Perrier,³⁶⁷ se basa en encontrar cadenas poliméricas que equilibren las restricciones estéricas que restringen el apilamiento de un número grande de CPs pero que, además, proporcionen una cierta protección al esqueleto peptídico para que los disolventes competidores de enlaces de hidrógenos (en los que normalmente se llevan a cabo los experimentos) no impidan la formación del nanotubo. En esta línea, se comprobó que dos cadenas poliméricas de polibutílacrilato ancladas en los extremos opuestos (a través de las cadenas laterales) al esqueleto de un *D,L*- α -ciclooctapéptido mediante una reacción de *click* podían restringir el crecimiento indiscriminado del nanotubo (Figura 59).³⁶⁸ En este trabajo, el grado de polimerización del poliácrlato, así como la mezcla de disolventes en los que se llevaron a cabo las medidas, resultaron ser factores clave sobre la longitud final del agregado (determinada por SANS). De esta manera, se consiguieron nanotubos integrados por un rango desde 170 hasta 400 unidades (longitudes de hasta 450 Å, aproximadamente).

Estas longitudes siguen siendo muy elevadas y además presentan una gran dispersión de valores como para que esta aproximación sea versátil en el desarrollo de muchas aplicaciones. Por tanto, se han explorado otras aproximaciones para preparar nanotubos de longitud definida más cortos que estos derivados poliméricos.

¹⁷ C. A. Mirkin, *Small* **2005**, *1*, 14-16.

²²⁵ M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, *366*, 324-327.

²³⁰ M. Silk, J. Newman, J. Ratcliffe, J. White, T. Caradoc-Davies, J. R. Price, S. Perrier, P. E. Thompson, D. K. Chalmers, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6613-6616.

³⁶⁷ J. Couet, M. Biesalski, *Small* **2008**, *4*, 1008-1016. R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1956-1963. R. Chapman, G. G. Warr, S. Perrier K. A. Jolliffe, *Chem.-Eur. J.* **2013**, *19*, 1955-1961.

³⁶⁸ R. Chapman, M. L. Koh, G. G. Warr, K. A. Jolliffe, S. Perrier *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2581-2589.

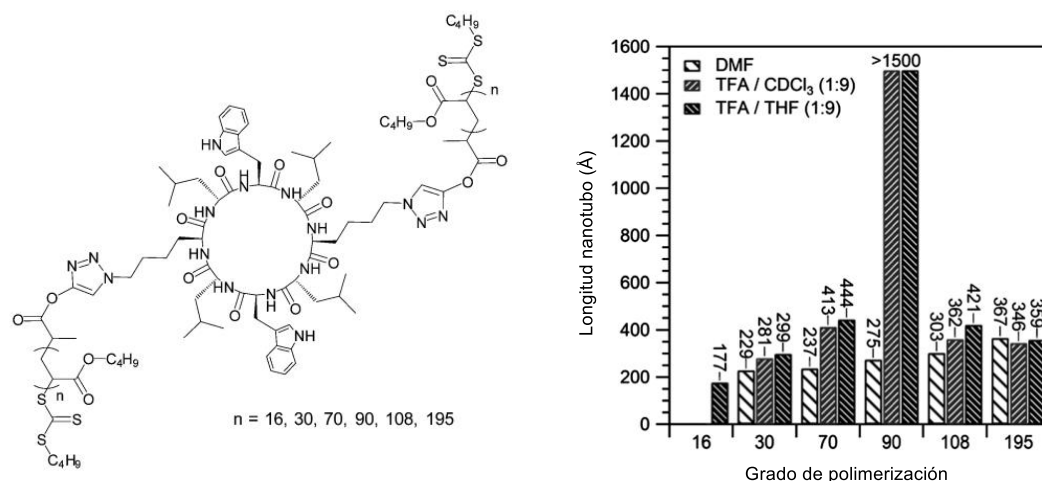


Figura 59. Híbrido de CP-polímero empleado por Perrier para la medida precisa de la longitud de los nanotubos a los que dan lugar.³⁶⁸

Particularmente, los tubos que se preparan a partir de la interacción de moléculas con forma de listón han sido los candidatos más empleados, ya que la longitud final del nanotubo está definida por la longitud de cada uno de los listones que se agregan para dar lugar a la estructura tubular. Un ejemplo típico de este tipo de arquitecturas son los oligómeros de *para*-fenilenos desarrollados por Matile,³⁶⁹ en los cuales sistemas con 6 y 8 anillos aromáticos con un perfil de sustitución en posición *para* incorporan otras cadenas (como por ejemplo péptidos) que permiten su agregación para dar nanotubos (Figura 60). En este caso, el exquisito control de la longitud del nanotubo se consigue a costa de unas rutas sintéticas no muy versátiles, que implican en todos los casos la unión covalente de las unidades de nuevos anillos aromáticos (suelen usarse derivados bifenílicos como precursores) lo que complica extender el diseño a sistemas constituidos por un número mayor de monómeros.

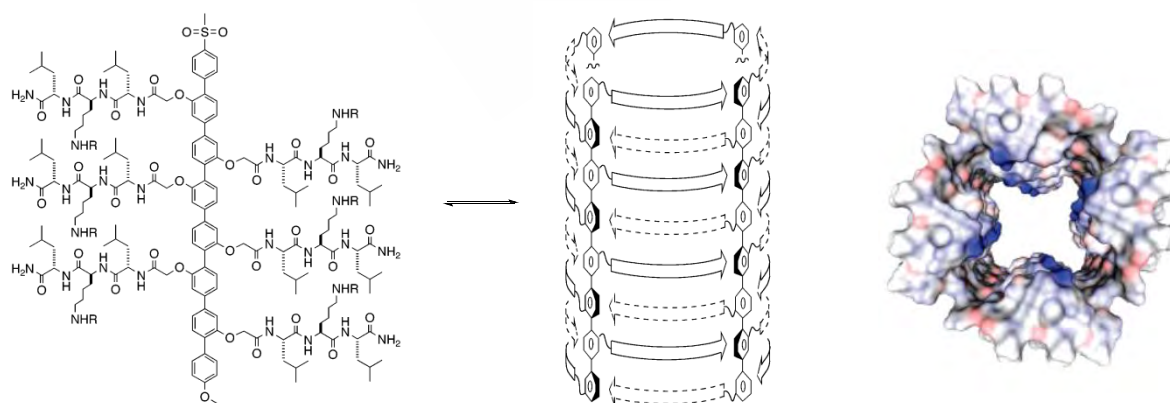


Figura 60. Nanotubos peptídicos constituidos por octa-fenilenos desarrollados en el grupo de Matile que presentan un control muy preciso de sus dimensiones longitudinales.

³⁶⁹ N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 79-87.

En vista de las problemáticas de ambas metodologías, planteamos la preparación de un sistema precursor de nanotubos que presente la capacidad de modular su longitud de una manera puramente supramolecular, con las ventajas que esto implica. Además, pretendemos llevar a cabo este proceso utilizando únicamente péptidos, sin recurrir a recubrimientos poliméricos ni ningún otro tipo de andamiajes moleculares, por lo que el control en el apilamiento se derive únicamente de los enlaces de hidrógeno entre los grupos amida. Para este fin, proponemos la combinación de CPs con propiedades de dimerización diferentes dentro de una misma estructura. De esta manera, las diferencias de dimerización (K_a) entre ambos ciclos podrían propiciar que se pueda modular el crecimiento mediante estímulos externos.

1. Diseño

En el momento de iniciar este proyecto solo se había llevado a cabo la unión covalente de ciclopéptidos idénticos a través de sus cadenas laterales. El grupo de Ghadiri había equipado los *D,L*- α -CPs formadores de dímeros con dos aminoácidos que presentaban en su cadena lateral un grupo reactivo como un alqueno terminal o un grupo tiol³⁷⁰. Gracias a estos grupos, con un CP que contenía dos residuos de homo-alilglicina era posible, tras el proceso de dimerización, atrapar uno de los rotoisómeros (el eclipsado) mediante una reacción de metátesis.³⁷¹ Posteriormente, en nuestro grupo de investigación, se extendió esta metodología a dímeros de α,γ -CPs, en los que se empleaban en la secuencia dos residuos de propargil-glicina (Pra) que actuaban como punto de anclaje en una doble reacción de Sonogashira³⁷² con la molécula 1,2-diyodobenceno.^{241e} Esta reacción provoca que el anillo aromático exógeno actúe como una grapa que fija la conformación rotoisomérica entre ambos ciclos. En nuestro caso particular, el objetivo consiste en llevar a cabo un diseño más funcional, por lo que pensamos en realizar el atrapado covalente de ambos ciclos directamente sobre su esqueleto, en una disposición del plano cenital, sobre aquellos grupos dispuestos en las entradas de la cavidad del dímero. Este anclaje tiene la ventaja de que no limita las propiedades externas del nanotubo resultante, que solo estarían determinadas por la elección apropiada de las cadenas laterales de los dos CPs.

Como hemos visto en la Introducción, en los últimos años se han obtenido una gran variedad de α,γ -CPs con diferentes tamaños compuestos por residuos de Acp.²⁴¹ Durante los estudios de los parámetros termodinámicos de los procesos de dimerización de estos macrociclos a través de su cara α se pudo comprobar que el valor de la constante de asociación K_a aumentaba progresivamente desde los ejemplos más pequeños basados en tetrapéptidos ($10\text{--}10^2\text{ M}^{-1}$)^{241a} hasta los octapéptidos y superiores, en los que las constantes se disparaban hasta superar valores de 10^8 M^{-1} .^{241c} Con esta información en la mano, decidimos diseñar una

³⁷⁰ M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed* **1999**, 38, 1598-1601.

³⁷¹ T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12364-12365.

³⁷² K. Sonogashira, Y. Tohda, N. A. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, 50, 4467-4470.

²⁴¹ a) Ciclotetrapéptidos: Ref. 237. b) Ciclohexapéptidos: R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713. c) Ciclooctapéptidos: R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269. R. J. Brea, M. J. Pérez-Alvite, M. Panciera, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 110-121. d) Ciclododecapéptidos y ciclododecapéptidos: R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269. e) Ciclohexadecapéptidos: R. J. Brea, *Diseño, síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ -ciclopéptidos* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (**2013**).

molécula precursora de nanotubos modulables que consistiese en dos α,γ -CPs de diferente tamaño, unidos covalentemente por su cara γ , y que presentasen intacta su capacidad para dimerizar por sus respectivas caras α , sobre las que se ejercería el control en el proceso de crecimiento del nanotubo. Concretamente, proponemos la síntesis de dos péptidos: un ciclooctapéptido y un ciclotetrapéptido con sus caras γ bloqueadas mediante la *N*-alquilación de los residuos de Acp. Los grupos alquílicos dispondrían de grupos funcionales complementarios que permitan establecer la unión entre ellos, formando un dímero covalente con capacidad para autoensamblarse por ambas caras, en las que existen diferencias notables de dimerización (Figura 61).

La elección de CPs de 4 y 8 Aa, independientemente de los motivos ya esgrimidos referentes a los valores de sus respectivas K_a , también se basó en términos de su simetría, ya que a la hora de realizar la unión covalente entre ambos es deseable que exista una cierta predisposición entre ambas unidades para reaccionar de manera precisa. De esta manera, se puede realizar un diseño en el que ambos ciclos presenten una simetría C_2 apropiada para que los grupos reactivos de ambos CPs se ubiquen uno sobre el otro en el aducto covalente final.

Como se ha comentado previamente, tras la planarización del anillo de los CPs, estos exponen los protones amídicos y los grupos carbonilos en una disposición perpendicular al plano del anillo lo que, precisamente, facilita su apilado supramolecular.²³⁵ Por ello, nos planteamos llevar el proceso de *N*-alquilación de los γ -Aas a un nuevo nivel, en el que, además de bloquear el crecimiento de los nanotubos por la cara γ , se pudiese dotar a esa cara con una reactividad adicional más allá del propio bloqueo. De esta manera, si se incluye en cada uno de los ciclopéptidos un número apropiado de cadenas alquílicas con grupos funcionales susceptibles de reaccionar con otros complementarios, sería posible la formación del aducto covalente en una última etapa, posterior a toda la síntesis peptídica. No obstante, la elección de estos grupos funcionales no es trivial, ya que la reacción que los una debe presentar una serie de características que permita la realización de este proceso de polimacrociclación de manera robusta. La reacción entre ambos grupos debe ser eficiente y transcurrir gran quimio- y regioselectividad, siendo compatible con otros posibles grupos funcionales. En base a esta condición, y teniendo en cuenta las consideraciones de simetría descritas previamente, planteamos la incorporación de dos cadenas que presenten un grupo azida en uno de los ciclopéptidos, mientras que el otro CP estaría funcionalizado con dos grupos alquino terminales (Figura 61). De esta forma, se puede llevar a cabo una reacción de cicloadición 1-3 dipolar catalizada por Cu(I) entre ambos grupos, normalmente conocida como reacción de *click*, cicloadición de Huisgen o CuAAC (de sus siglas en inglés *Copper-catalized Azide-Alkyne Cycloaddition*).³⁷³ Esta reacción ha cobrado mucha importancia en los últimos años por su eficiencia y versatilidad, lo que la convierte en un candidato aventajado a la hora de llevar a cabo transformaciones complejas sobre intermedios de alto valor sintético y/o en pasos finales de procesos multietapa, como en nuestro caso. Además, la incorporación sobre el átomo de nitrógeno de ambos grupos funcionales en etapas tempranas de la síntesis (ver a continuación) no supone ningún impedimento en el proceso de la síntesis peptídica, ya que ambos grupos son robustos frente a condiciones ácidas o básicas fuertes y además son inertes frente a electrófilos o nucleófilos. Uno de los desafíos que presenta este diseño es la diferencia de tamaño de los dos macrociclos, por lo que la longitud de las cadenas alquílicas que conectan el esqueleto

²³⁵ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

³⁷³ L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 2933-2945. J. E. Hein, V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1302-1315.

peptídico y los grupos reactivos deben ser adecuadas para que se pueda producir la doble reacción.

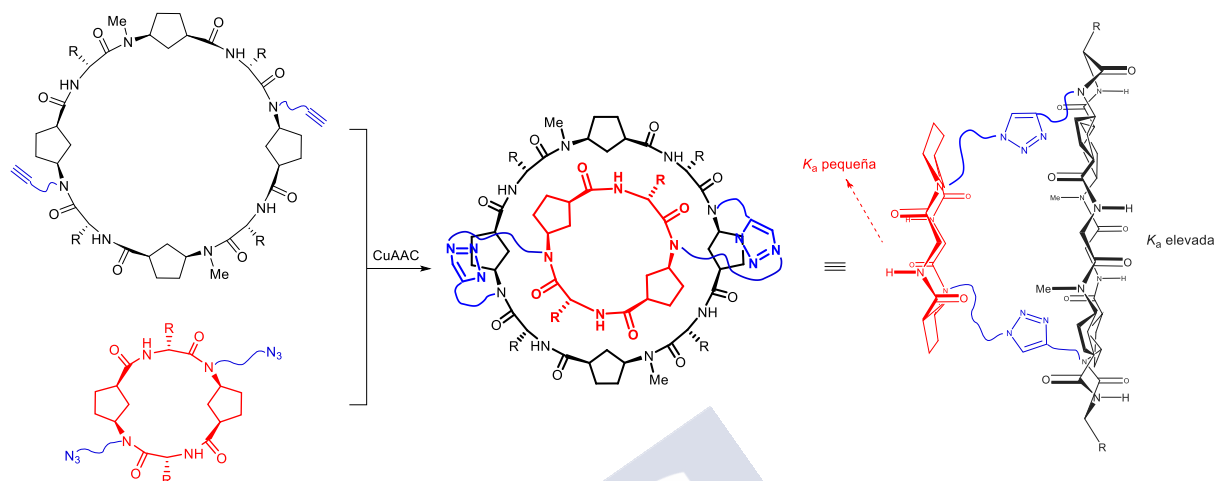


Figura 61. Estrategia propuesta para preparar los sistemas covalentes *bis*-ciclopeptídicos con propiedades de apilamiento diferente en cada uno de sus extremos.

Al inicio de esta tesis doctoral, en nuestro grupo de investigación se estaba desarrollando una metodología que permitiese llevar a cabo la incorporación de cadenas alquílicas a la carta sobre el átomo de nitrógeno del γ -Acp, ya que las metodologías de alquilación directas que se empleaban para la *N*-metilación fracasaban al emplear electrófilos de mayor tamaño. Esta estrategia se basaba en el procedimiento descrito por Fukuyama para la monoalquilación de aminas primarias, que pasaba por la utilización de un grupo protector temporal que aumentase la acidez del protón sobre la amina.³⁷⁴ Este grupo temporal consiste en una sulfonamida aromática pobre en electrones, que incorpora un grupo nitro en su posición *orto* o *para* el cual aumenta notablemente la acidez del protón del grupo sulfonamida por efecto inductivo. Este grupo es conocido como nosilo, por acotación de su nombre completo, 2- o 4-nitrobenzenosulfonilo. Con la incorporación del nosilo se consigue que el valor de pKa de dicho protón se sitúe por debajo de 15 unidades, notablemente menor que para las aminas, amidas o carbamatos. Esto facilita su sustracción mediante condiciones básicas suaves, respetuosas con otros grupos funcionales sensibles a condiciones fuertemente básicas. En nuestro caso, este punto es de vital importancia, ya que el carbono α presenta un protón relativamente ácido ($pK_a \sim 25$) por estar cerca de un grupo éster, lo que imposibilita el uso de condiciones básicas más agresivas. Tras llevar a cabo la desprotonación en medio básico suave de la sulfonamida, se puede capturar el anión generado con cualquier electrófilo poco impedido estéricamente, lo que genera la especie *N*-funcionalizada. Otra ventaja del grupo nosilo son las condiciones que habitualmente se utilizan para su eliminación, un proceso que se lleva a cabo normalmente mediante el tratamiento con tioles en medio básico, los cuales son capaces de realizar una sustitución aromática nucleófila sobre el anillo pobre en electrones la cual, a través de un intermedio de Meisenheimer, acaba generando un tioéter, liberando SO_2 y la amina libre en el

³⁷⁴ T. Kan, T. Fukuyama, *Chem. Commun.* **2004**, 353-359.

proceso (Figura 62).³⁷⁴ Estas condiciones parecen compatibles y ortogonales con otros grupos protectores empleados en la síntesis peptídica.

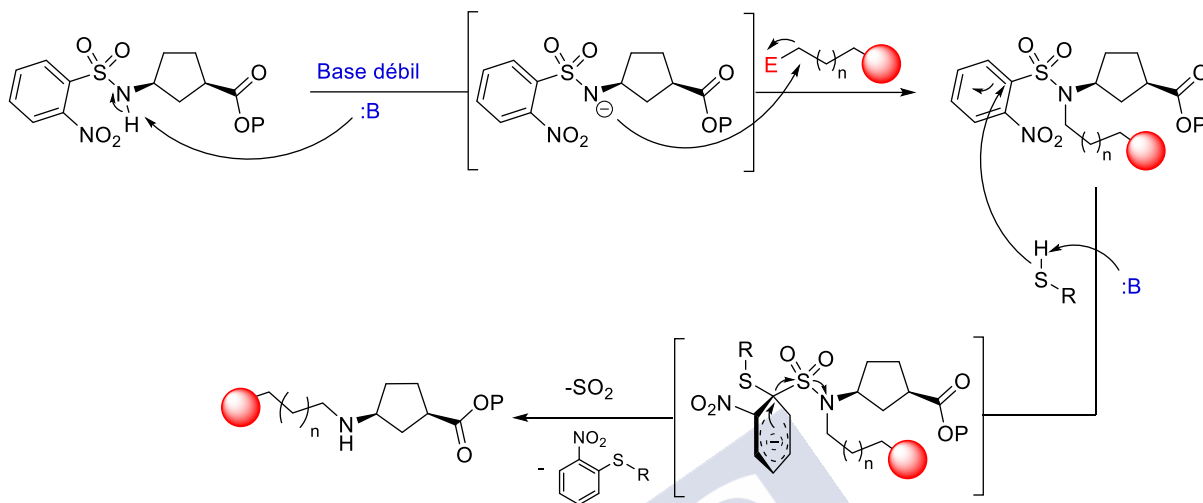


Figura 62. Estrategia de monoalquilación del γ -Aa Acp mediante el método de Fukuyama.

2. Metodología sintética

Tras sentar las bases del diseño requeridas para el funcionamiento apropiado de nuestra estrategia de apilamiento supramolecular, procedimos con la síntesis del sistema covalente compuesto por dos ciclopeptidos de tamaño diferente. Este proceso empezó por la obtención de la forma enantiopura del γ -Aa en el que se basarán todos los diseños presentados en esta memoria, el Acp (concretamente su enantiómero *L*). Esta sustancia de partida se prepara a partir de un precursor comercial, la lactama de Vince, en tres etapas (Figura 63).^{241b} La primera de ellas consiste en la hidrólisis ácida de la lactama mediante el tratamiento con HCl acuoso, seguida de la introducción del grupo carbamato de *tert*-butilo (Boc) sobre la amina mediante el tratamiento con el anhídrido de Boc en medio básico. De esta manera se obtiene la mezcla racémica del aminoácido Ace protegido en su extremo amino-terminal.

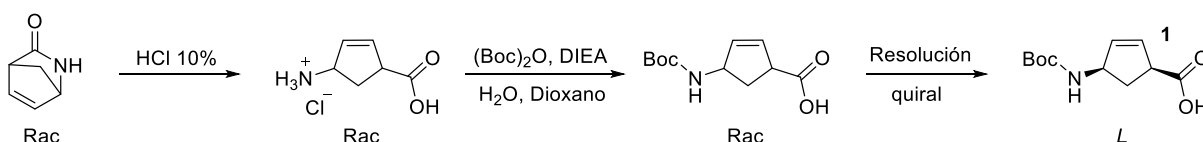


Figura 63. Primeras etapas en la síntesis del γ -Aa empleado a lo largo de esta memoria a partir de la lactama de Vince (izquierda).

Puesto que para la síntesis peptídica es preciso trabajar con la forma enantioméricamente pura de cada Aa, se procedió a su resolución mediante las técnicas de cristalización clásica.

Este método consiste en la formación de una pareja de diastereoisómeros a partir de un par de enantiómeros mediante el tratamiento con un reactivo quiral. De esta manera se generan dos especies diastereoméricas las que, al contrario que sucede con los enantiómeros, poseen propiedades diferentes. Este hecho hace que su separación sea factible si se utiliza una técnica apropiada. En este caso particular, la resolución se llevó a cabo utilizando la 1-feniletanamina en su forma enantiopura. De esta forma, las sales formadas por la interacción entre el ácido del γ -Aa y la amina presentan una relación de diastereoisomería, lo que permite explotar sus diferencias de solubilidad de las sales generadas en determinados disolventes. Concretamente, gracias a los estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación,^{241b} es conocido que si se utilizan mezclas de CHCl_3 y hexano, una de estas sales precipita mientras que la otra se mantiene soluble en disolución, por lo que un simple proceso de filtración permite el enriquecimiento de las muestras en uno de los enantiómeros (Figura 64). Otro factor importante en la elección de esta amina quiral auxiliar viene determinado por el bajo coste de ambos enantiómeros, factor que debe ser tenido en cuenta en este tipo de procesos en los que ambos enantiómeros son de interés y se trabaja en escalas relativamente grandes.

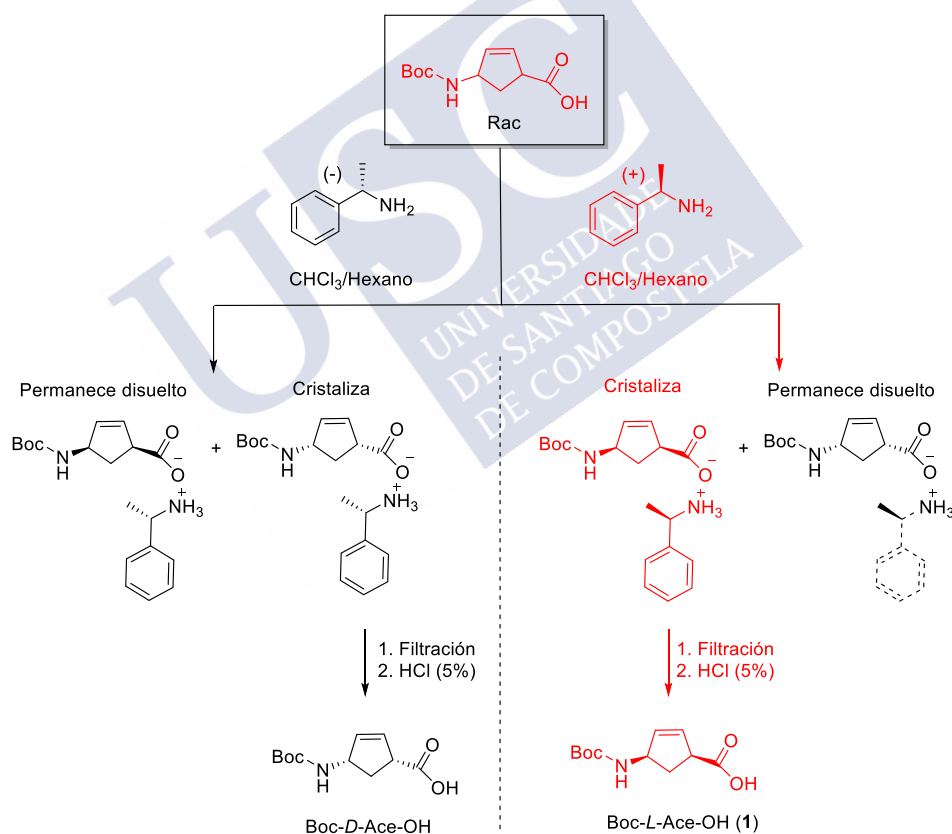


Figura 64. Proceso de resolución enantiomérica del γ -Ace mediante su cristalización con una amina quiral. En rojo se muestra la ruta seguida en particular durante este trabajo, que proporciona el isómero *L* de dicho aminoácido.

Concretamente, la primera cristalización se realizó usando una mezcla CHCl_3 /Hexano (4:1) como disolvente y empleando solo 0.6 equiv del enantiómero dextrorrotatorio de la amina

quiral [(*R*)-1-feniletanamina]. Como se muestra en la Figura 64, este enantiómero propicia la cristalización del enantiómero 1*S*,4*R* del aminoácido, al que hemos denominado como el isómero *L* por su analogía con el α -Aa que sustituye en el diseño de los nanotubos (Introducción, Figura 28).²⁵⁰ A pesar de que los primeros núcleos de cristalización aparecieron al cabo de 24 horas, el proceso se prolongó durante una semana para obtener una cantidad razonable del aminoácido resuelto. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró y el sólido obtenido se suspendió en CH₂Cl₂ para luego lavarlo con HCl diluido, de forma que el ácido carboxílico se protona y se libera la sal. De esta manera, esta fracción de CH₂Cl₂ queda enriquecida en el enantiómero de interés, mientras que las aguas madres lo hacen en la sal del enantiómero opuesto. En este punto, se midió la rotación óptica de la fracción enriquecida para comprobar el exceso enantiomérico obtenido tras la primera cristalización. El valor obtenido de $[\alpha]_D^{298} = -15^\circ$ resultó estar todavía alejado a los valores descritos en la bibliografía ($[\alpha]_D^{298} \approx -50^\circ$),^{241b} por lo que procedimos a repetir este proceso. Para la segunda cristalización, se aumentó la cantidad de la amina quirale hasta 1 equiv y se redujo la proporción de hexano utilizado en la mezcla de disolventes, ya que una cristalización demasiado rápida podría ser perjudicial en la resolución. Tras este segundo proceso ($[\alpha]_D^{298} \approx -36^\circ$), fue necesaria realizar una tercera cristalización para alcanzar un valor cercano al deseado, concretamente $[\alpha]_D^{298} = -49.1^\circ$.

En este punto, decidimos utilizar un método más robusto para la determinación precisa del exceso enantiomérico de nuestra muestra enriquecida, dada la gran relevancia que tiene comenzar la síntesis con el máximo de enantiopureza en cada uno de los monómeros. En este caso, nos decantamos por la utilización de HPLC con una fase estacionaria quiral para determinar el exceso enantiomérico en las muestras que presentaban valores de rotación óptica cercanos al valor objetivo. Como se puede observar en la Parte experimental (Figure 1), la comparación entre la integral de los picos correspondientes a cada enantiómero permitió determinar que el exceso enantiomérico de la muestra **1** estaba en torno al 99%. Aunque no es de relevancia para este trabajo, hay que destacar que esta metodología permite también el tratamiento posterior de las fracciones de aguas madres obtenidas tras cada una de las cristalizaciones previamente descritas. En este caso, su cristalización con el enantiómero levorrotatorio de la amina, de nuevo repitiendo el proceso hasta tres veces, permite obtener el enantiómero 1*R*,4*S* del Ace con un exceso enantiomérico similar.

Tras la obtención de la forma enantiopura del Ace (**1**), se procedió a su hidrogenación catalítica heterogénea sobre Pd/C en EtOH, lo que permitió la obtención de Boc-*L*-Acp-OH (**2**) de forma cuantitativa. Como hemos comentado previamente (Introducción, Sección 1.3.2), la síntesis de CPs con el derivado insaturado Ace presenta bastantes problemas, por lo que en este trabajo únicamente hemos trabajado con su variante insaturada Acp, exclusivamente como isómero *L* (1*S*,3*R*).

En este punto, se procedió a la incorporación de los grupos alquílicos sobre la amina del Aa, para lo cual se siguieron dos estrategias diferentes. Por motivos de diseño, decidimos que el α,γ -ciclooctapéptido incluyese dos cadenas con alquinos terminales (concretamente grupos propargilo) y además, dos grupos metilo de manera intercalada, para restringir completamente cualquier posibilidad de interacción γ - γ entre CPs. Por otro lado, incorporaremos dos cadenas de propilazida sobre los residuos de Acp que componen el tetrapéptido, para que exista el suficiente espacio para que los ciclos se aproximen y reaccionen en la última etapa de la síntesis. La primera etapa en este aspecto consistió en la *N*-metilación del Acp, que se llevó a cabo de una manera directa sobre el compuesto **2** mediante el tratamiento con una base fuerte (NaH) y

MeI en THF seco. Este proceso genera un dianión (carboxilato y carga negativa sobre el nitrógeno) en el cual únicamente reacciona el grupo amina en estas condiciones, lo que evita la epimerización del carbono α y da lugar al compuesto **6** que, por conveniencia, se utiliza en la siguiente etapa sin purificación adicional (ver más abajo).

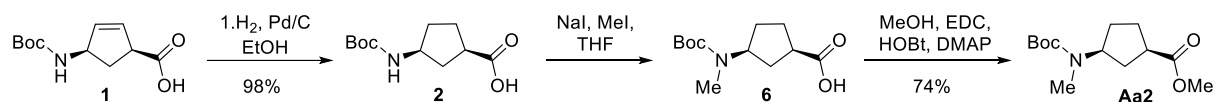


Figura 65. Protocolo de *N*-metilación del Acp a partir del derivado de Ace **1**.

Por otro lado, se esterificó **2** con MeOH en presencia de EDC·HCl, HOBt y DMAP, lo que dio lugar al éster **3** en buen rendimiento. Con posterioridad comprobamos que el rendimiento de esta etapa se puede mejorar utilizando MeI en medio básico suave, lo que proporciona **3** cuantitativamente. Para la *N*-alquilación de Fukuyama con las otras cadenas funcionales se substituyó en primer lugar el grupo protector Boc por el grupo nosilo. Este proceso se realizó mediante tratamiento de **3** con una mezcla de TFA y CH₂Cl₂, seguido del acoplamiento con el cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo en presencia de DIEA, lo que permitió aislar la sulfonamida **4** en excelentes rendimientos.³⁷⁵ Este intermedio se pudo alquilar mediante tratamiento con K₂CO₃ anhidro en presencia de un exceso de diferentes electrófilos. Concretamente, el uso del tosilato del 3-azidopropan-1-ol (**9**), obtenido a partir del 3-bromopropan-1-ol en dos etapas (ver Parte experimental), o el 3-bromoprop-1-ino permitieron aislar los compuestos alquilados **5** y **7** en excelentes rendimientos. Esta transformación puede realizarse en disolventes polares como el ACN o la DMF, en los que la base presenta una solubilidad parcial. En ninguno de los dos casos se observaron cantidades apreciables (<5%) del epímero en el C α a la vista del espectro de ¹H RMN (desdoblamiento hacia campo bajo de la señal del H α en torno a 2.9 ppm). Una vez llevada a cabo la incorporación de las cadenas reactivas, se procedió a la retirada del grupo nosilo, la cual se realizó mediante el tratamiento con tiofenol en medio básico suave, dando lugar en pocas horas a ambos aminoácidos *N*-funcionalizados (**Aa1** y **Aa3**) en rendimientos en torno al 75%. Estas especies presentan una amina secundaria desprotegida, por lo que ya están disponibles para emplearse en la primera etapa de la síntesis peptídica. Por otro lado, el Aa *N*-metilado **6** se esterificó usando condiciones análogas a las descritas previamente para **2** de doble activación con carbodiimida y HOBt, lo que permitió obtener el compuesto **Aa2** diprotegido como carbamato de *tert*-butilo y éster metílico. Esta etapa es necesaria ya que los α -Aas empleados en las rutas sintéticas se utilizaron en forma de ácido libre.

³⁷⁵ Aunque no se incluye en esta memoria, se pudo comprobar que la sulfonamida derivada del 4-nitrobenzenosulfonilo presenta un comportamiento prácticamente análogo en las etapas de protección, alquilación y desprotección. De hecho, a la hora de *N*-funcionalizar con cadenas impedidas estéricamente, este isómero puede ser más conveniente que el anillo con un grupo nitro en posición *orto*.

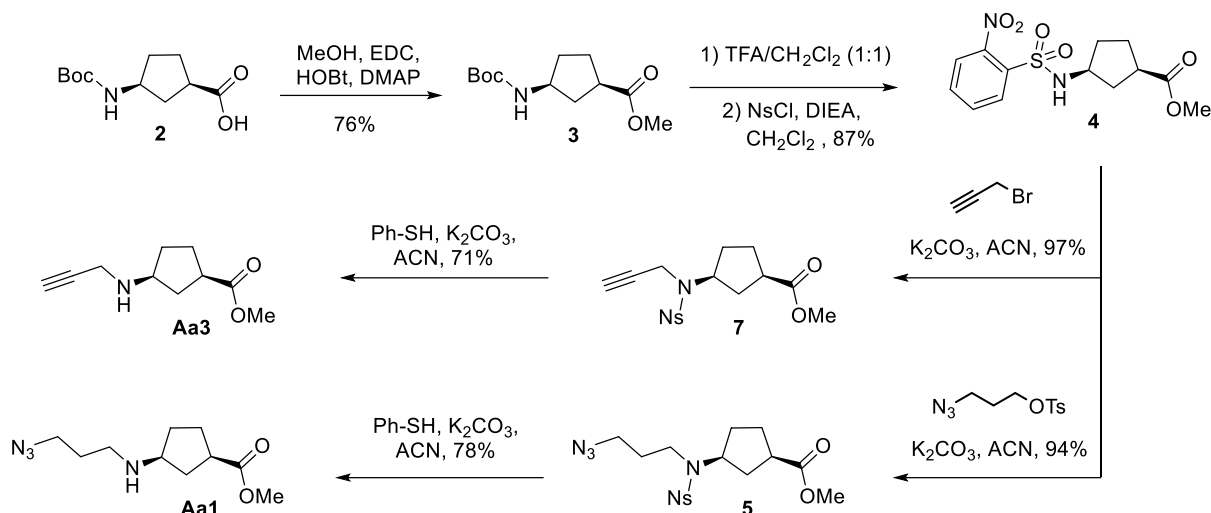


Figura 66. Ruta sintética empleada para la obtención de los Aas *N*-alquilados **Aa1** y **Aa3** a partir del precursor **2**.

Una vez preparados los tres γ -Aa sintéticos, comenzamos con la etapa del crecimiento de los péptidos lineales. Este proceso se llevó a cabo en disolución utilizando una estrategia convergente basada en la interconexión de las unidades repetitivas en cada ciclo. Esto es, la repetición de dos unidades del dipéptido Boc-*D*-Leu-^{C3N3}*N*-*L*-Acp-OMe (**dip1**, Figura 67) en la síntesis de **CP1** y la repetición del tetrapéptido Boc-*D*-Leu-^{Me}*N*-*L*-Acp-*D*-Leu-^{prop}*N*-*L*-Acp-OMe (**tet2,3**, Figura 70) para la preparación **CP2**. Este tetrapéptido se obtiene mediante el acoplamiento de los dipéptidos Boc-Leu-^{Me}*N*-*L*-Acp-OMe (**dip2**) y Boc-Leu-^{prop}*N*-*L*-Acp-OMe (**dip3**, Figura 70). Para la formación de dichos dipéptidos se optó por combinar el γ -Aa correspondiente con la Boc-*D*-Leu-OH, ya que confiamos en que las propiedades hidrofóbicas de la cadena lateral de este Aa le otorguen a los CP finales una buena solubilidad en los disolventes apolares en los que llevaremos a cabo los estudios posteriores (CHCl₃, por ejemplo).

La decisión de optar por una estrategia en disolución frente a la alternativa habitual de la síntesis peptídica en fase sólida se debe a varios factores. El primero y más importante deriva de la necesidad de utilizar grandes excesos de los distintos Aas durante los protocolos de acoplamiento en fase sólida, lo que, en nuestro caso, al emplear residuos sintéticos de elevado valor añadido, limita en gran medida esta opción. Además, la mitad de nuestros acoplamientos se deben llevar a cabo sobre las aminas secundarias, menos activas que los típicos Aas naturales, lo que complica el proceso especialmente en los acoplamientos con péptidos relativamente largos. En nuestra aproximación, estos acoplamientos de aminas secundarias se llevan a cabo en la primera etapa del crecimiento del péptido exclusivamente, por lo que este problema se minimiza enormemente. Por último, al utilizar Leu como único α -Aa, no quedaría otro remedio que realizar la etapa de ciclación en disolución, ya que se tendría que anclar el péptido a la resina a través del grupo carboxilo terminal, puesto que la cadena lateral no presenta esa posibilidad.³⁷⁶

³⁷⁶ P. Cherkupally, G. A. Acosta, S. Ramesh, B. G. de la Torre, T. Govender, H. G. Kruger, F. Albericio, *Amino Acids* **2014**, *46*, 1827-1838.

Como ha quedado patente con la descripción de la síntesis de los precursores, nuestra estrategia de grupos protectores se basará en la utilización del carbamato de *tert*-butilo (Boc, sensible al medio ácido) para proteger los extremos *N*-terminales y del éster metílico (sensible a hidróxidos alcalinos) en el grupo ácido. Ambos métodos de incorporación y desprotección son ortogonales entre sí y no presentan incompatibilidad ni con el grupo alquino ni con la azida.

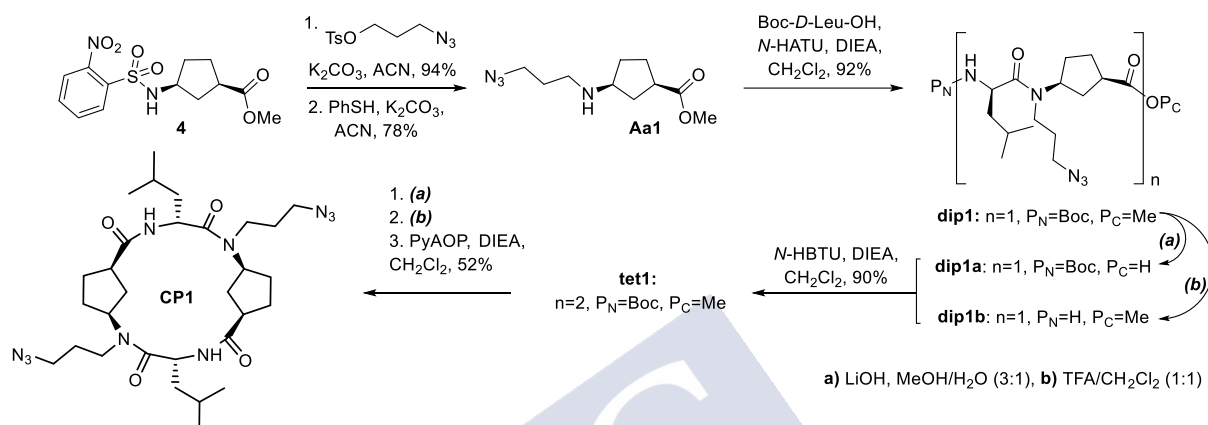


Figura 67. Ruta sintética empleada para la obtención del α,γ -ciclotetrapéptido **CP1**, que incorpora dos cadenas 3-azidopropílicas en su estructura.

Para la obtención de **CP1**, comenzamos por la preparación de **dip1** mediante el acoplamiento peptídico entre **Aa1** y la Boc-D-Leu-OH comercial. Este proceso se llevó a cabo empleando *N*-HATU como agente de acoplamiento junto con la base no-nucleófila DIEA en CH₂Cl₂ (Figura 67). Bajo estas condiciones se pudo aislar el dipéptido de interés en muy buen rendimiento (92%). Este dipéptido, unidad fundamental del CP objetivo, se separó en dos porciones. Una de ellas se trató con una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ para eliminar el Boc del grupo amina de la Leu. La segunda fracción se trató con LiOH en una mezcla de MeOH/H₂O para dar lugar al ácido **dip1a**. Ambas etapas tienen un rendimiento prácticamente cuantitativo. Estos fragmentos se acoplaron entre sí utilizando una metodología análoga a la empleada para la formación de los dipéptidos, pero en esta ocasión se optó por *N*-HBTU como agente de acoplamiento. La elección de uno u otro reactivo de acoplamiento (Figura 68) viene determinada por la dificultad para llevar a cabo dicha reacción, de tal manera que *N*-HATU, más reactivo, se utiliza en acoplamientos de aminas secundarias mientras que *N*-HBTU, con una actividad más modesta pero un menor coste y una mayor estabilidad en disolución, se utiliza en los acoplamientos con aminas primarias.³⁷⁷

³⁷⁷ A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

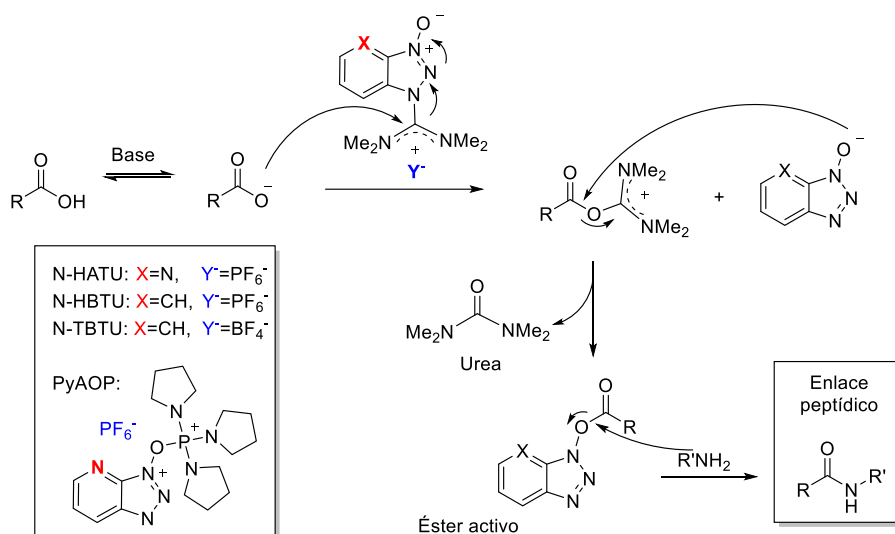


Figura 68. Mecanismo de formación de enlaces peptídicos mediante la utilización de agentes de acoplamiento basados en sales de uronio/guanidinio y fosfonio.

Tras la obtención de **tet1**, se llevó a cabo su desprotección secuencial en ambos extremos (empezando por el grupo ácido) y por último se llevó a cabo la ciclación en condiciones de muy alta dilución en CH_2Cl_2 (0.25 mM), utilizando medio básico y PyAOP como reactivo de acoplamiento. Estas condiciones de dilución son necesarias para evitar un acoplamiento intermolecular previo al proceso de ciclación que conduzca a precursores de mayor tamaño (octámeros, dodecámeros, etc). Esto es debido a que la ciclación de los ciclotetrapéptidos no está demasiado favorecida por motivos de tensión en el esqueleto peptídico.^{241b} A pesar de estas precauciones, tras llevar a cabo una purificación rápida en columna del crudo de la ciclación, pudimos observar mediante RMN la aparición de señales características de un subproducto que identificamos como el ciclooctapéptido (Figura 69, azul) cuya presencia, aunque minoritaria con respecto al producto deseado (rojo), hizo necesaria una etapa de purificación adicional mediante HPLC. Este paso adicional permitió aislar en exclusiva el producto deseado **CP1** con un rendimiento cercano al 50%.

A continuación, procedimos con la síntesis de **CP2** (Figura 70), que se compone de dos unidades de **Aa2**, dos unidades de **Aa3** y 4 residuos de *D*-Leu. Como en el caso anterior la primera etapa consistió en la preparación de los dipéptidos. Para ello, se acopló el derivado *N*-metilado **Aa2** y la Boc-*D*-Leu-OH, para lo que, en primer lugar, se trató el primero con un medio ácido fuerte para desproteger su grupo amina y permitir la formación del enlace peptídico. Este proceso se llevó a cabo empleando nuevamente la mezcla de N-HATU y DIEA en CH_2Cl_2 , y proporcionó el producto deseado (**dip2**) en buen rendimiento (80%). Por otro lado, el monómero propargilado **Aa3**, carente de grupo protector sobre el extremo *N*-terminal se acopló de manera directa en idénticas condiciones con Boc-*D*-Leu-OH proporcionando **dip3** con un excelente rendimiento (96%).

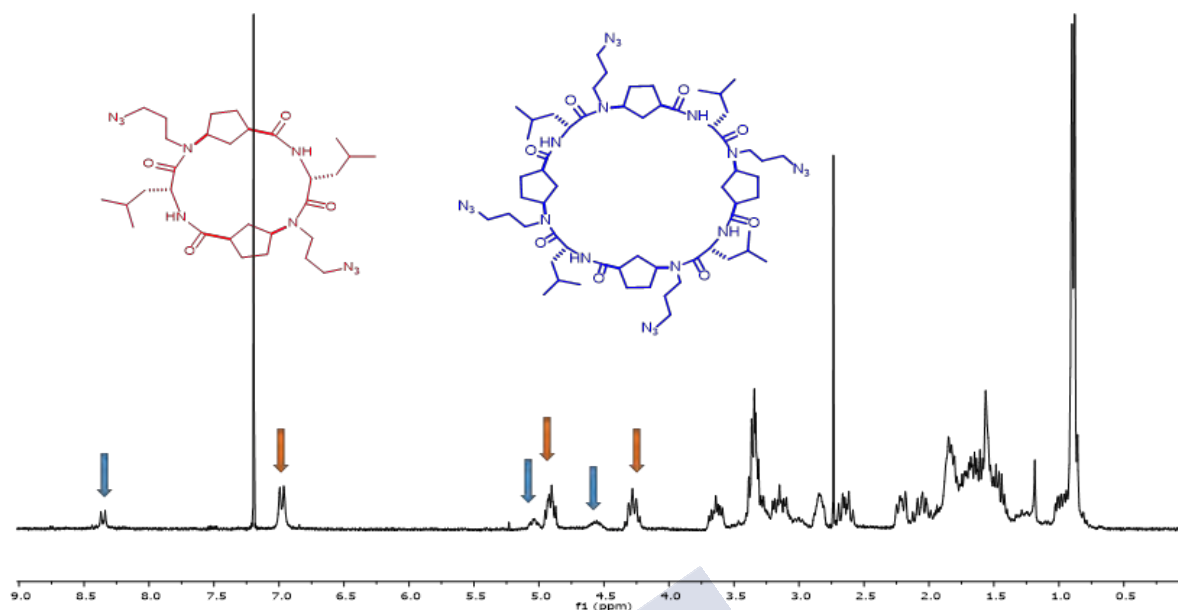


Figura 69. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) del crudo de la etapa de ciclación para obtener **CP1** (en rojo), que muestra un juego de señales adicionales que se corresponden con el subproducto (en azul) derivado de un acoplamiento intermolecular previo a la ciclación intramolecular.

Una vez preparados los dipéptidos correspondientes, procedimos con la síntesis del tetrapéptido protegido **tet2,3**. Con este fin, desprotegimos el extremo amino de **dip3** mediante el tratamiento con una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 y el extremo ácido de **dip2** mediante la hidrólisis del éster metílico con LiOH en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1), transcurriendo ambas etapas en rendimientos cuantitativos. El acoplamiento de ambos sustratos utilizando las condiciones de acoplamiento típicas con *N*-HBTU, dio lugar al correspondiente tetrapéptido (**tet2,3**) con un rendimiento superior al 90%. Como en la anterior síntesis, se dividió la cantidad obtenida en dos porciones, se desprotegieron los extremos C- o N-terminales de cada fracción y posteriormente se acoplaron para dar lugar al **oct2,3**. Siguiendo los protocolos típicos descritos con anterioridad, se preparó el octapéptido lineal en un 72% para las tres etapas. Finalmente se llevó a cabo la formación del ciclo, tras las desprotecciones sucesivas de los extremos del péptido, mediante el tratamiento de una disolución 2 mM del precursor peptídico en CH_2Cl_2 con *N*-TBTU en presencia de DIEA. La elección de este agente activante se debió a su mayor tiempo de vida en el medio de reacción, especialmente adecuado para estos procesos intramoleculares en los que la transformación procede en tiempos de reacción de varias horas en condiciones anhidras. Bajo estas condiciones se aisló **CP2** en un rendimiento del 60%, bastante satisfactorio considerando los rendimientos típicos de las etapas de ciclación.

La última etapa sintética de la ruta consistió en la unión covalente entre las cadenas reactivas de ambos ciclopéptidos (**CP1** y **CP2**) mediante la reacción de *click*. Esta cicloadición ha cobrado una gran importancia en los últimos tiempos debido principalmente a su bioortogonalidad y gran eficacia, además de su relativa versatilidad al ser empleada en una gran variedad de sustratos, desde proteínas hasta polímeros o macrociclos.³⁷⁸

³⁷⁸ L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, *21*, 1393-1415. C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075-1101.

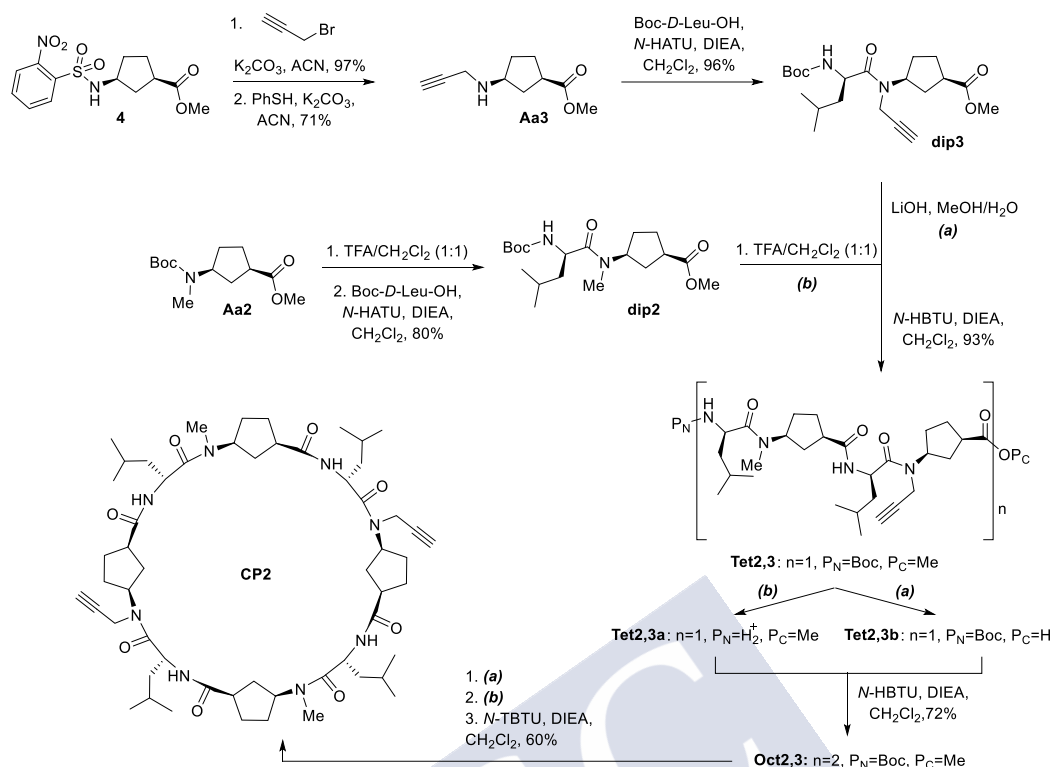


Figura 70. Ruta sintética empleada para la obtención de **CP2** a partir de **Aa2** y **Aa3**.

Gran parte de la abundante bibliografía generada en este ámbito describe procedimientos basados en condiciones acuosas o mezclas de agua y diversos alcoholes, que emplean principalmente la pareja de Cu_2SO_4 y ascorbato sódico como precursores de la especie catalítica de Cu(I) .³⁷⁹ En nuestro caso particular, tras explorar diferentes condiciones usando este sistema catalítico con este tipo de disolventes no fuimos capaces en ningún caso de observar la formación del compuesto deseado. Sospechamos que podía ser debido a la baja solubilidad de los precursores peptídicos en estos medios, ya que son sustancias notablemente hidrofóbicas. Tras realizar algún intento en sistemas heterogéneos como $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, nos decantamos finalmente por explorar condiciones puramente orgánicas que garantizaran la correcta solubilidad de ambos precursores. En esta línea, decidimos adaptar unas condiciones de reacción descritas por el grupo de Beer,³⁸⁰ en las cuales la reacción se llevaba a cabo en CH_2Cl_2 puro (bajo condiciones de alta dilución) y empleaba un *cocktail* compuesto por el catalizador de Cu(I) $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6]$, DIEA y TBTA como ligando complementario. A pesar de que este catalizador de Cu(I) soluble en medio orgánico es conocido por su tendencia a la oxidación (que obliga a extremar las condiciones anhidras y anaerobias durante la reacción), el complejo que el Cu forma con el ligando tripodal TBTA favorece la reacción en términos globales, la que transcurre según alguno de los mecanismos descritos en la Figura 71.

³⁷⁹ V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9879-9883.

³⁸⁰ S. C. Picot, B. R. Mullaney, P. D. Beer, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 6230-6237.

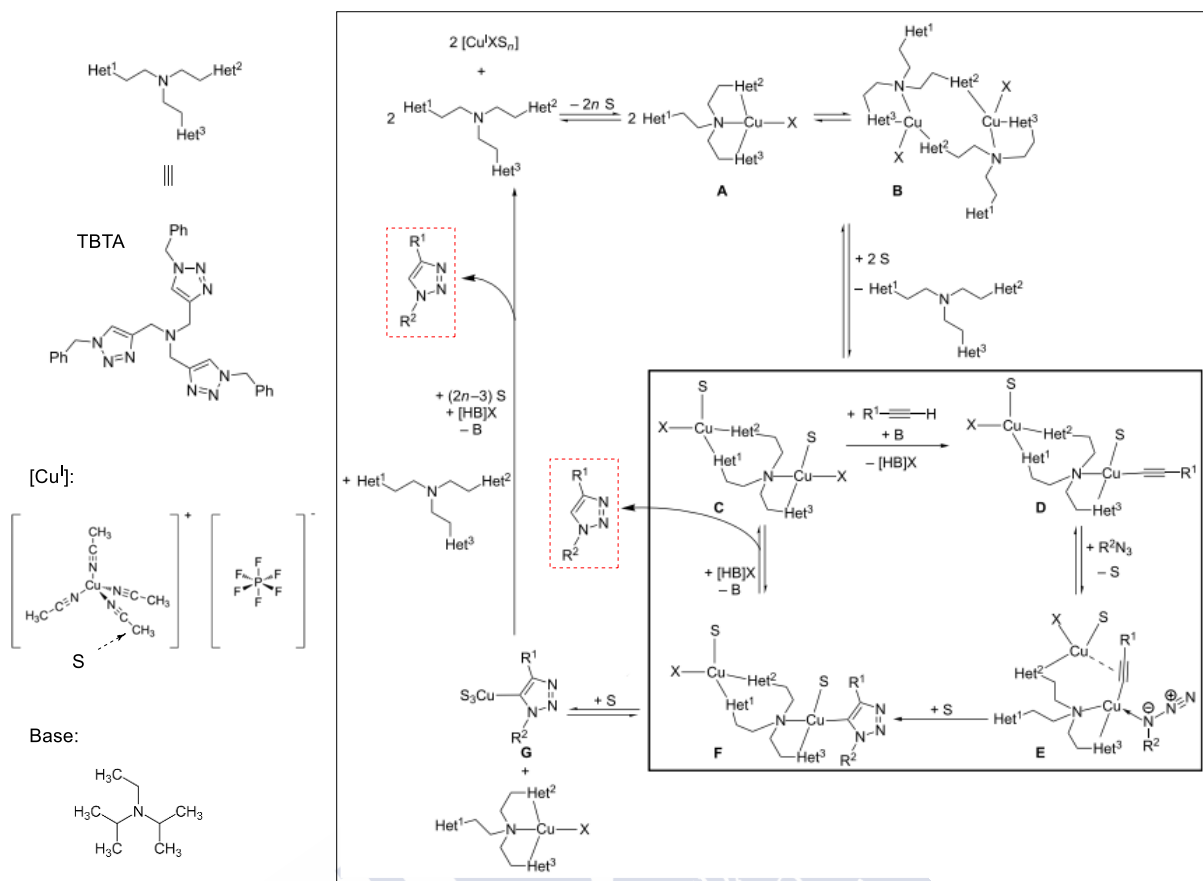


Figura 71. Propuestas mecanísticas³⁸¹ para la reacción CuAAC empleando el catalizador $[Cu(MeCN)_4PF_6]$ en presencia de TBTA y DIEA (izquierda).

Esta metodología proporcionó el aducto covalente esperado (**CP3**, Figura 72) con rendimientos cercanos al 50%. Puesto que se consumían todas las sustancias de partida (conversión del 100%), pensamos que es muy probable que también se estuviesen formando oligómeros, a pesar de trabajar en condiciones de alta dilución. Estos subproductos estarían derivados de hipotéticas reacciones secundarias en las que, tras la formación del primer anillo triazólico, se produjesen uniones intermoleculares en vez de la segunda cicloadición intramolecular. Esta hipótesis se fundamenta en que observábamos la aparición de un precipitado completamente insoluble tras la reacción (incluso tras añadir co-disolventes polares próticos o tras el aumento de la temperatura) y la observación de la aparición en el crudo de reacción de otro compuesto con tiempo de retención similar en HPLC e idéntico peso molecular. Sin embargo, el RMN de protón mostraba una complejidad mucho mayor que el del producto deseado. Claramente este comportamiento se puede atribuir a una pérdida de la simetría en este subproducto debido a la formación de un único anillo de triazol (Figura 72, parte inferior derecha). Este último comportamiento puede sugerir que la segunda CuAAC es más difícil que la primera, por lo que se abre la puerta a la formación de oligómeros derivados de reacciones intermoleculares.

³⁸¹ R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2715-2750. V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2210-2215.

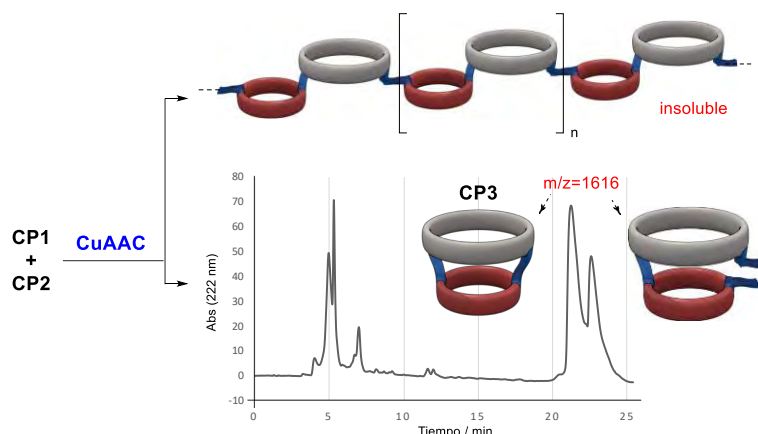


Figura 72. Diferentes especies obtenidas tras la reacción de *click* entre los sustratos **CP1** (anillo rojo) y **CP2** (anillo gris), donde el conector triazólico se muestra en color azul.

3. Estudios de dimerización y formación de nanotubos

Una vez obtenida la cantidad apropiada del dímero covalente **CP3**, procedimos a estudiar su versatilidad como precursor de nanotubos a la carta. Experimentos preliminares de RMN llevados a cabo en CDCl_3 puro, revelaron un espectro que contenía todas las señales características del *bis*-ciclopéptido covalente, en los que muchas de las señales aparecían duplicadas, con dos juegos de señales que no presentaban la misma integración (ver más abajo). Este fenómeno deriva de la propia naturaleza del fragmento octapeptídico que forma parte de **CP3**, cuyo comportamiento aislado analizaremos a continuación. Este CP presenta un eje de simetría C_2 y puede generar dos isómeros no superponibles (rotoisómeros) tras la formación del dímero correspondiente. De esta forma, se puede producir una especie dimérica en la que dos residuos equivalentes (*N*-metilados, por ejemplo) de ciclos diferentes se posicionen próximos entre ellos tras el apilamiento o en el que residuos no equivalentes (*N*-metilado y *N*-propargilado) sean los que se sitúen más cerca. Estos dímeros se han denominado como eclipsado (*syn*) y alternado (*anti*) respectivamente, tal como puede apreciarse en la Figura 73.

Cabe destacar que mediante estudios de ROESY, fue posible determinar que la especie mayoritaria se correspondía con el dímero eclipsado (relación de 1.5:1), gracias al nOe cruzado entre los NHs de las Leu ($\delta > 8$ ppm, típico de formación de enlace de hidrógeno) no equivalentes, tal como se remarca con la flecha de color verde en parte izquierda de la Figura 73. Por último, comprobamos que el espectro de protón de esta especie no cambiaba al modificarse las condiciones de temperatura o de concentración de la muestra, ni al realizarse en presencia de pequeñas cantidades (hasta el 20%) de disolventes próticos competidores por el enlace de hidrógeno como el MeOH, por lo que concluimos que, tal y como esperábamos, la constante de asociación de este CP es mayor de 10^5 .^{241c}

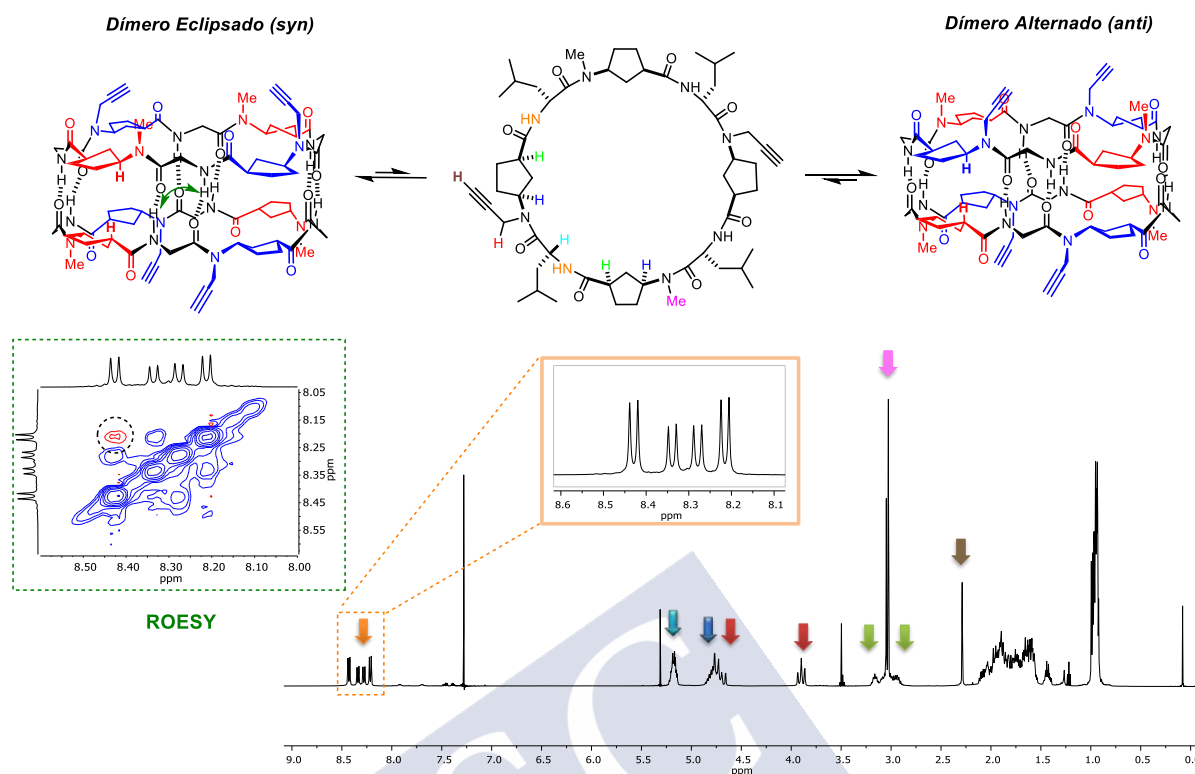


Figura 73. Análisis mediante ^1H RMN (CDCl_3 , 10 mM aprox.) de los diferentes rotoisómeros que presenta **CP2**, como puede apreciarse claramente por la presencia de dos juegos de señales para las señales de los NHs de las leucinas en torno a 8-8.5 ppm (naranja). En la parte izquierda se muestra una ampliación del espectro de ROESY de esa misma región, que identifica al isómero eclipsado como mayoritario (espectro completo en el Anexo).

En base a la formación de estos dos rotoisómeros en **CP2** se explica también la duplicidad de las señales en algunos protones de la muestra de **CP3** (donde la relación se dispara hasta ser 3:1), tal como se aprecia en la región de los NH de las leucinas del ciclooctapéptido (8.1-8.4 ppm, involucradas en la formación del dímero). Las señales del protón del anillo de triazol (7.9-8.0 ppm) o incluso en la señal de los dos grupos NHs del anillo más pequeño (δ variable entre 6 y 6.75 ppm, Figura 74), el cual no presenta esa asimetría *per se*, pero le viene dada por la dimerización en la cara opuesta. Estas últimas señales presentaron además las características típicas de estar envueltas en un equilibrio rápido (señales anchas) y débil entre la forma monomérica y dimerica, ya que su desplazamiento químico estaba fuertemente influido por factores tales como la concentración de la muestra o la temperatura. De esta manera, el proceso de dilución de la muestra (Figura 74, del trazo rojo al azul) y el aumento de la temperatura (ver Parte Experimental, Figure 3) producían un desplazamiento de estas señales a campo alto, confirmando que el equilibrio del anillo tetrapeptídico se desplazaba hacia la forma monomérica. Por otra parte, al aumentar la concentración y/o reducir la temperatura del sistema, el equilibrio se desplazaba hacia la formación de los dímeros, en donde las señales aumentan su desplazamiento químico como consecuencia de la interacción mediante enlaces de hidrógeno. Este proceso dio lugar a un gran cambio en el desplazamiento químico de estas señales, abarcando desde los 5.75 ppm (40°C, 0.95 mM) hasta aproximadamente los 6.85 ppm (10°C, 4 mM).

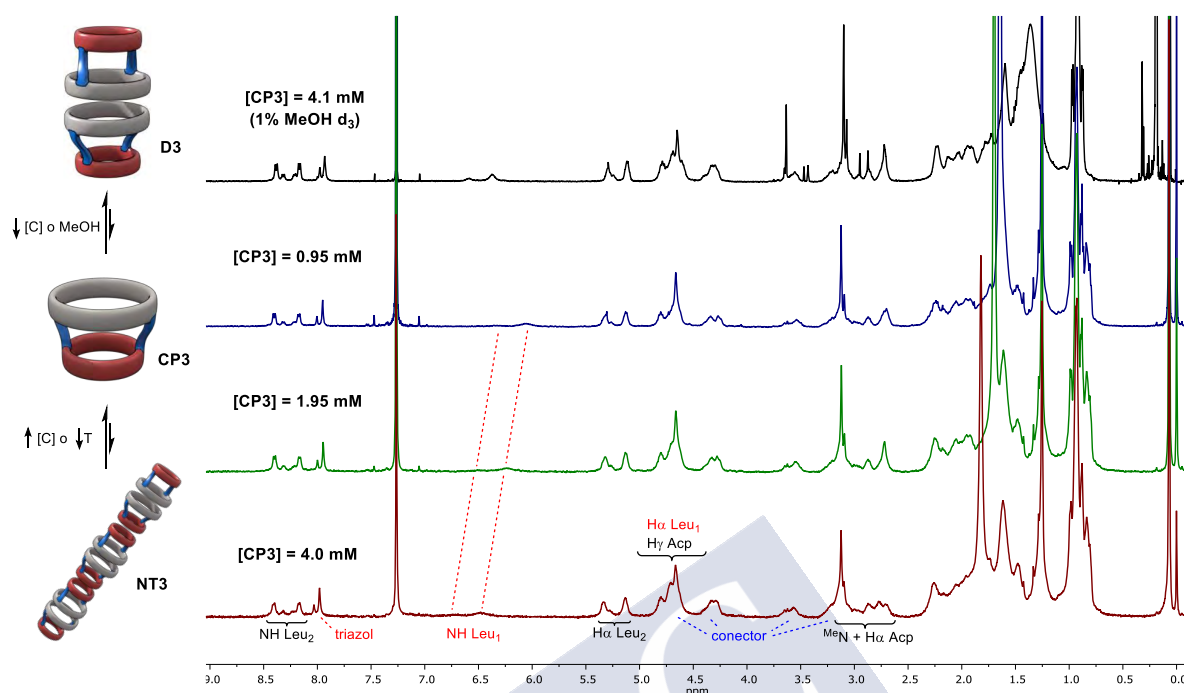


Figura 74. Espectros de ^1H RMN obtenidos para muestras de **CP3** en CDCl_3 (trazas azul, verde y roja) y tras la adición de una pequeña cantidad de $\text{MeOH } d_3$ a 20°C , donde se indican las señales más características del sistema.³⁸²

A concentraciones por encima de 4 mM en CDCl_3 puro, el espectro empezaba a mostrar un ancheamiento notable de las señales que se acompañaba con la aparición de turbidez y la formación de un precipitado blanco en el seno de la disolución orgánica. No obstante, en presencia de pequeñas cantidades (1-2%) de un co-disolvente que compita por los enlaces de hidrógeno, como el MeOH , se pudo apreciar una mayor definición en las señales (especialmente los NH del ciclotetrapéptido), así como la ausencia de precipitado por encima de 4 mM (Figura 74, traza negra). Todas estas observaciones son consistentes con el comportamiento que esperábamos para este sistema, ya que las variaciones en el espectro de RMN dejan entrever el equilibrio que existe en el sistema entre la formación del dímero **D3** y el **NT3** (Figura 74, izquierda) en función de cuán favorecida esté la dimerización a través de la cara con una constante de asociación más débil. En las condiciones ensayadas se demuestra que la formación del dímero a través de la cara α del ciclooctapéptido en ningún momento se ve comprometida, en base a la inalterabilidad de las señales de sus protones amídicos. Por tanto, la aparición del nanotubo, la cual justifica el ancheamiento de las señales y la formación de precipitación a concentraciones elevadas, puede verse alterada por las condiciones externas ($[\text{C}]$, T o co-disolventes).

Con el fin de profundizar en el estudio de la dimerización a través del tetrámero, ya que esta es la unidad clave que determinaría la posibilidad de ejercer un cierto control externo sobre el autoensamblaje, decidimos llevar a cabo un estudio más riguroso sobre las características

³⁸² Leu₁ hace referencia a las señales de los residuos que provienen del esqueleto de **CP1** (rojo en Figura 74), mientras que Leu₂ se refiere a los residuos que anteriormente formaban parte de **CP2** (gris en Figura 74).

termodinámicas del proceso de equilibrio. Puesto que era la primera vez que se realizaban estudios sobre CPs que tuviesen unidos otros macrociclos adicionales en su plano vertical, pensamos que sería conveniente comprender en primer lugar si la capacidad de dimerización a través de esta cara se veía comprometida por la presencia de dichos sustituyentes. Por ello, decidimos comparar los valores de K_a de **CP1** en solitario frente a **CP3**, para evaluar si este último pudiese llegar a presentar estas penalizaciones torsionales.

Para realizar el cálculo de las variables termodinámicas de la dimerización de **CP1** se midieron los desplazamientos químicos de los NH de las Leu a diferentes temperaturas (desde -40 °C hasta +40 °C) y a diferentes concentraciones (entre 1 y 40 mM) en un disolvente inerte en términos de competición de enlace de hidrógeno, como el CDCl_3 . Pudimos apreciar que estas señales tenían una gran movilidad dependiendo de las condiciones en las que se recogiese el espectro, con valores, por ejemplo, desde 6.2 a 7.3 ppm en las concentraciones más baja y alta, respectivamente, a 20°C (Parte Experimental, Figure 2). A continuación, se realizó un ajuste para cada grupo de datos (Figura 75) siguiendo una ecuación de regresión no lineal (Ec. 1), la cual había sido propuesta por LaPlanche y colaboradores,³⁸³ y que correlaciona el desplazamiento químico (δ): de las señales de los NH con la constante de asociación (K_a) en un proceso de equilibrio monómero-dímero (para cada temperatura).

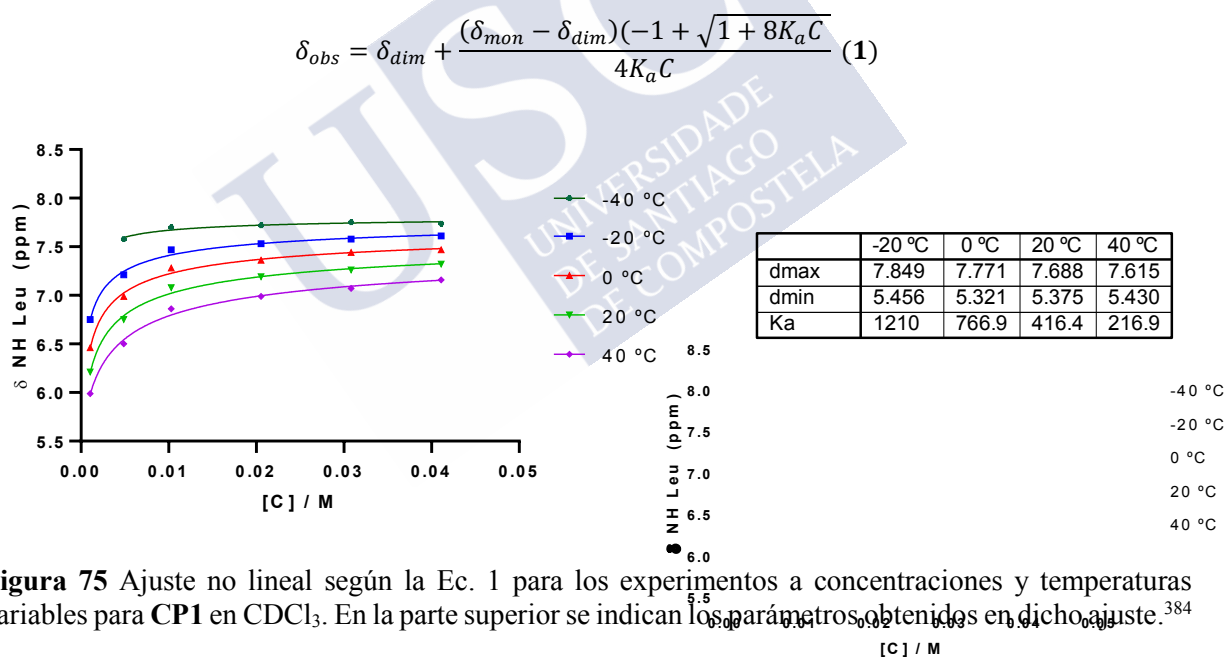


Figura 75 Ajuste no lineal según la Ec. 1 para los experimentos a concentraciones y temperaturas variables para **CP1** en CDCl_3 . En la parte superior se indican los parámetros obtenidos en dicho ajuste.³⁸⁴

Una vez obtenido un valor de K_a para cada temperatura, se correlacionó $\log(K_a)$ con el inverso de la temperatura ($1/T$) mediante la Ecuación de Van't Hoff (Ec. 2) que permitió el cálculo del valor de ΔH y ΔS en el proceso de equilibrio.³⁸⁵

³⁸³ L. A. LaPlanche, H. B. Thompson, M. T. Rogers, *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, 1482-1488.

³⁸⁴ dmax = δ_{dim} en y dmin = δ_{mon} en la Ec. 1. El valor de δ_{obs} a -40°C para $[C]=0.95$ mM no fue determinado en base a la anchura que presentaba dicha señal en el espectro, lo que imposibilitaba determinar la posición exacta de su punto medio.

³⁸⁵ J. H. van't Hoff, *Études de Dynamique chimique*, Frederik Muller & Co., Ámsterdam, **1884**.

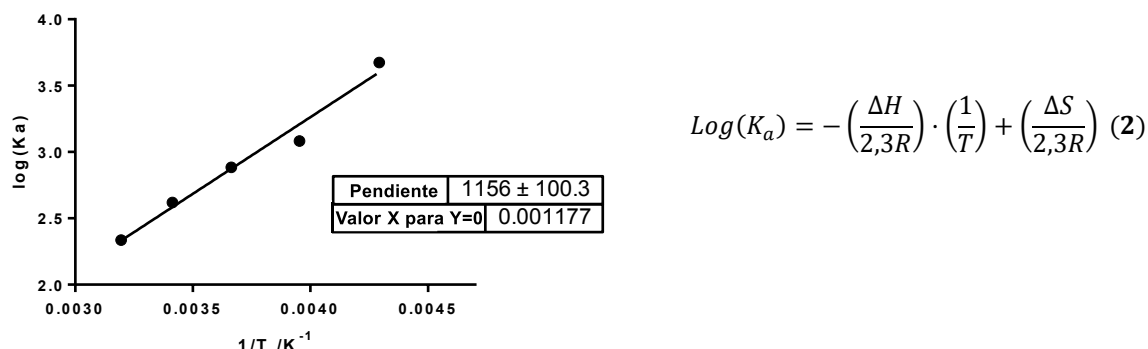


Figura 76. Recta de Van't Hoff para el proceso de dimerización de **CP1** obtenida a partir de los valores representados en la Figura 75.

De esta manera, el proceso de autoensamblaje a 25°C en CDCl_3 tiene una constante de asociación de $K_a = 329 \text{ M}^{-1}$ con unos parámetros termodinámicos de $\Delta H = -22.1 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta S = -26.0 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$. Estos datos ponen de manifiesto que el proceso de autoensamblaje está dirigido entálpicamente, gracias a la formación de enlaces de hidrógeno, mientras que está desfavorecido entrópicamente, debido al aumento en el orden del sistema al pasar de una especie monomérica a una dimérica. Además, hay que destacar que el valor de K_a es en torno a 7 veces mayor que para otros α,γ -ciclotetrapéptidos *N*-metilados previamente descritos.^{241a}

A continuación, procedimos con el análisis análogo del proceso de dimerización menos favorable presente en **CP3**, en donde rápidamente nos percatamos de que se nos presentarían varias dificultades. Por un lado, como ya se ha comentado anteriormente, la solubilidad de esta especie está restringida a valores por debajo de 4 mM aproximadamente (estimado en base a la integración relativa entre un patrón interno, TMSS, y algunas señales de referencia en **CP3**). Por otro lado, la pobre definición de las dos señales de los NHs, cuyo desplazamiento químico exacto debe ser conocido para llevar a cabo el análisis, restringía este procedimiento, ya que el ancheamiento excesivo de estas señales imposibilitó la determinación de sus desplazamientos por debajo de 0°C, al diluirse en la propia línea base del espectro. Tras ponderar estos dos problemas decidimos desistir en el proceso de llevar a cabo un análisis cuantitativo análogo al realizado previamente para **CP1**, aunque sí se pudo hacer una comparación de tipo cualitativo entre ambas estructuras (Figura 77). Como se aprecia en este análisis, los desplazamientos químicos de las dos especies diméricas presentes en **CP3** (líneas continuas en la Figura 77) flanquean de manera prácticamente paralela a los desplazamientos observados para **CP1** (líneas discontinuas), por lo que consideramos de manera aproximada, un valor de K_a del tetrapéptido de **CP3** próximo al del **CP1**. Podemos afirmar pues que no se observa un efecto negativo para la dimerización al anclar otro ciclopéptido de manera covalente sobre el α,γ -ciclotetrapéptido.

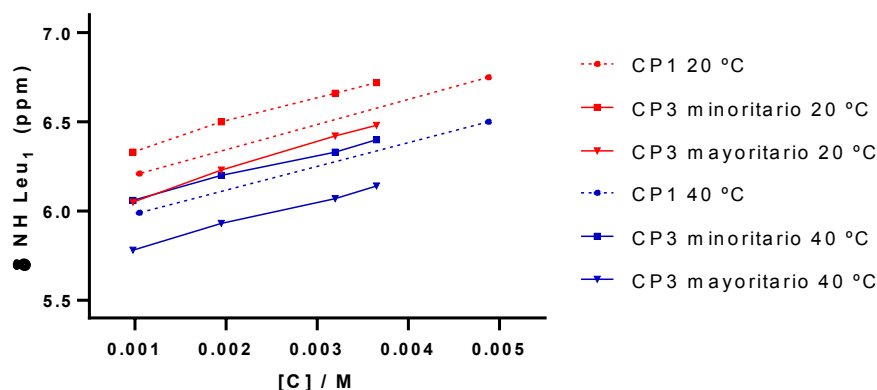


Figura 77. Evaluación de las variaciones de los desplazamientos químicos de los protones amídicos de los residuos de Leu del ciclotetrapéptido (eje Y) frente a la concentración de las muestras en **CP1** y **CP3**.

A continuación, decidimos continuar explorando la versatilidad de este sistema mediante la introducción en escena de un ciclopéptido adicional que permitiera la formación de heterodímeros. En base a los antecedentes existentes en este campo, descritos a lo largo de las secciones 1.3.2 y 1.3.4 de la Introducción, decidimos emplear el α,γ -ciclooctapéptido **CP4**, compuesto por 4 unidades de $^{\text{Me}}\text{N-L-Ach}$ y otras 4 unidades de *D*-Phe, el cual puede dar lugar a complejos heteroméricos con **CP3**.^{241b} La decisión de formar heterodímeros con el octapéptido de **CP3** se debe a que el comportamiento de la cara opuesta, como hemos visto previamente, es fácilmente modulable, por lo que entendemos que, actuando sobre el ciclooctapéptido, que en otras condiciones forma dímeros que no responden a ningún estímulo, se puede introducir un grado de complejidad adicional al sistema.

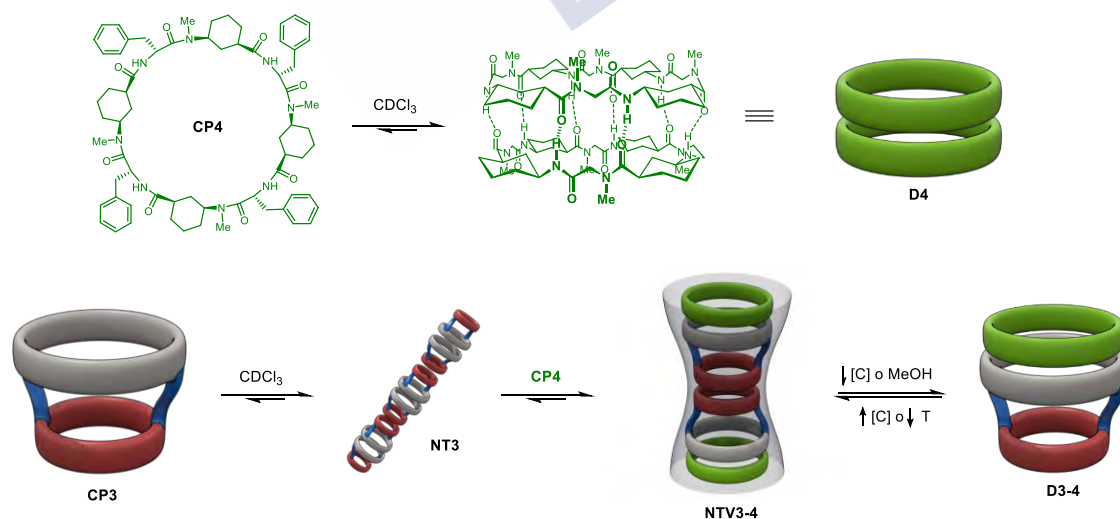


Figura 78. Arriba: estructura de las formas monomérica y dimérica de **CP4** basado en el aminoácido Ach. Debajo: propuesta de empleo de **CP4** para el incremento de la diversidad estructural de los nanotubos basados en el *bis*-ciclopéptido **CP3**.

A nivel estructural (Figura 78), la incorporación de este CP supondría el bloqueo efectivo del crecimiento supramolecular de **CP3** hacia **NT3**. La formación de manera preferente del heterodímero **D3-4** frente a **D3** (Figura 74) bloquea el crecimiento por dicha cara (**CP4** está *N*-metilado en su cara γ) quedando restringido a una dimerización por la cara opuesta, lo que daría lugar a un nanotubo formado por seis péptidos apilados que por su forma hemos denominado como nanotubo Venturi³⁸⁶ (**NTV3-4**). Además, la nueva especie **D3-4** presentaría unas características de dimerización débiles idénticas a las de **CP3** por su cara estrecha, por lo que el equilibrio entre dicha especie y **NTV3-4** puede ser controlado usando la misma estrategia de concentración, temperatura y pequeños porcentajes de disolventes competidores que hemos descrito con anterioridad.

Para corroborar estas propuestas estructurales, procedimos a la formación de los derivados heterodiméricos en CDCl_3 , siguiendo la evolución del sistema por RMN de protón a temperatura ambiente. La adición de cantidades crecientes de **CP4** sobre una disolución sobresaturada de **CP3** (>5 mM) proporcionó cambios notables en las señales, inicialmente anchas. Además, se observaba la desaparición del precipitado blanco presente en el seno de la disolución al inicio de la valoración, lo que implica que los agregados supramoleculares de **NT3** con elevado peso molecular ya no están presentes en la muestra.

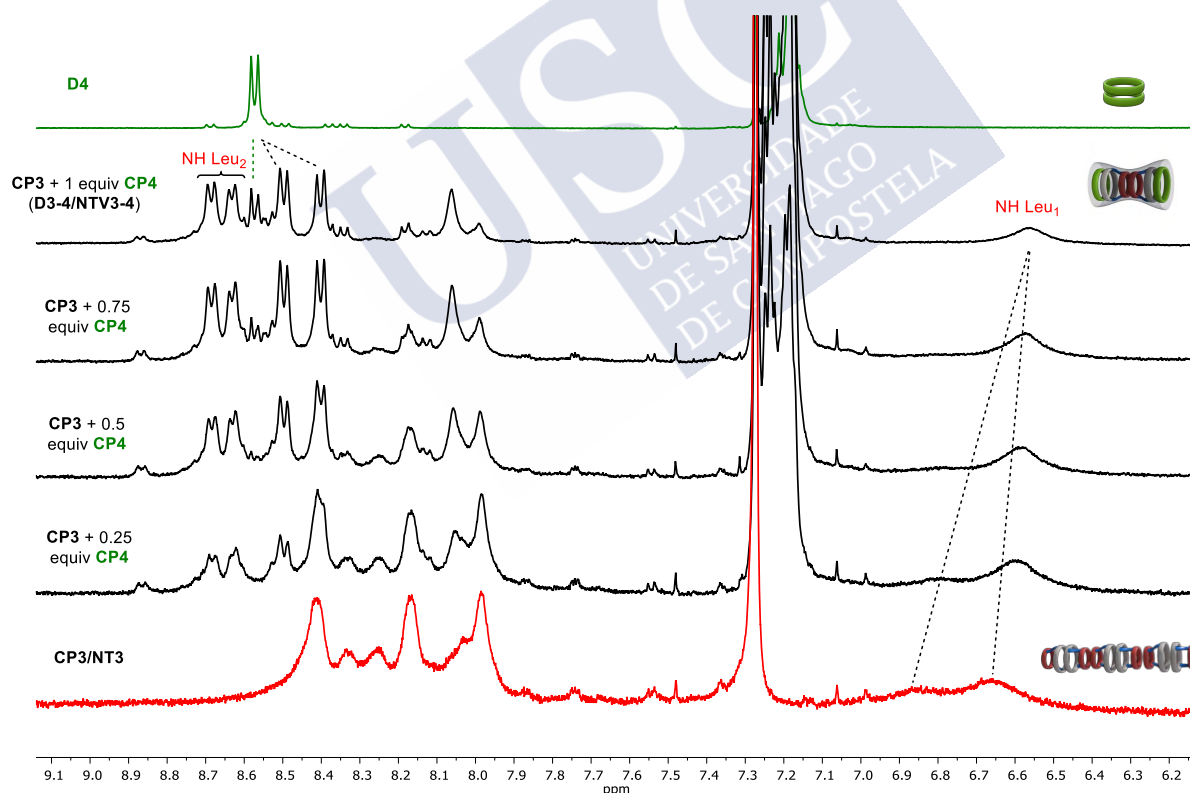


Figura 79. Adición de cantidades crecientes de **CP4** sobre una muestra sobresaturada de **CP3** en CDCl_3 .

^{241b} R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

³⁸⁶ Los tubos de Venturi son instrumentos que se emplean en ingeniería y presentan una zona interna constreñida que acelera el flujo del fluido que transcurre a través de ellos.

Como se puede observar en la Figura 79, a medida que se van añadiendo cantidades crecientes del péptido de Ach sobre el aducto covalente de Acp, se aprecia la disminución progresiva en la intensidad de las dos parejas de señales de **CP3** (en rojo), así como la aparición progresiva de otras señales asociadas a la formación del heterodímero **D3-4**. Si analizamos en detalle el caso de los NHs de los ciclooctapéptidos, se aprecia como las dos parejas originales de **CP3**, con intensidades relativas de 3:1, situadas entre 8.1 y 8.5 ppms dan lugar a una única pareja de dobletes de igual intensidad que aparecen a campo más bajo (8.7 ppm, NH Leu₂ en la Figura 79). Esta simplificación también se observa en el caso de los NHs del ciclotetrapéptido (NH Leu₁ en la Figura 79), que pasan de aparecer como dos señales anchas a dar lugar a una única señal tras la adición de 1 equiv de **CP4**. Esta aparente simplificación se debe a que en la especie heterodimérica no existe la posibilidad de formación de distintos rotoisómeros, ya que todos los residuos de ^{Me}N-Ach son indistinguibles dentro de **CP4** (eje de simetría C₄).

Sin embargo, en el caso del NH de los residuos de Phe de **CP4**, en el momento en el que pasan a formar parte del complejo heterodimérico **D3-4**, su equivalencia original (un único doblete en la traza verde de **D4**) se desvanece al estar ahora formando enlace de hidrógeno con un ciclopéptido en el que no todos los grupos carbonilo son equivalentes, ya que el carbonilo de la Leu que está unida a un residuo de ^{Me}N-Acp no es idéntico al que está unido a un ^{prop}N-Acp. Esto implica que la señal de NH de **CP4** que en su forma dimérica se encuentra a en torno a 8.6 ppm, en la especie **D3-4** genere dos dobletes a campo ligeramente más alto (8.5 y 8.4 ppm). Se puede observar que, a pesar de que la especie heterodimérica deseada es de largo la especie mayoritaria, aparece un doblete claro en el desplazamiento químico original del NH de **D4**, por lo que es probable que, debido a alguna imprecisión experimental, en realidad se haya añadido una cantidad de este CP ligeramente superior a la equivalencia. No obstante, también se observa que quizás queden algunas tenues señales residuales de la especie **D3** o **NTV3**, por lo cabe la posibilidad de que la K_a del proceso de heterodimerización no sea lo suficientemente grande en comparación con las K_a de homodimerización como para desplazar el equilibrio completamente hacia la forma heterodimérica. En cualquier caso, esta especie es minoritaria, lo que, sumado a la presencia de trazas de impurezas provenientes de la muestra de **CP4**, hace que el análisis de la estabilidad relativa de ambas especies se complique.

Para finalizar este capítulo, planteamos la utilización de una técnica adicional como los experimentos de difusión en RMN para la estimación del tamaño de las especies supramoleculares que se han ido comentando a lo largo de este capítulo. En los últimos años, los experimentos de difusión³⁸⁷ se han generalizado para convertirse en una interesante herramienta que permite conocer el tamaño de las moléculas en disolución. La variable física que se obtiene de dichos experimentos se conoce como coeficiente de autodifusión (D_t), que representa el resultado de los movimientos aleatorios de origen térmico que cada molécula exhibe de manera natural en un disolvente. Este dato se correlaciona directamente con el radio hidrodinámico (r_h)³⁸⁸ de una molécula a través de la ecuación de Einstein-Stokes (Ec. 3), la cual, dependiendo de diversos factores, puede ser ajustada (como veremos más adelante) para realizar correcciones en función de la naturaleza de las partículas estudiadas.³⁸⁹ Más concretamente, los experimentos de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*)³⁹⁰ son

³⁸⁷ W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.* **1997**, 9, 299-336.

³⁸⁸ El valor de r_h calculado mediante medidas de difusión suele encontrarse entre los valores experimentales obtenidos mediante difracción de rayos-X y teóricos mediante cálculos de van der Waals.

³⁸⁹ J. T. Edward, *J. Chem. Educ.* **1970**, 47, 261.

³⁹⁰ C. S. Johnson Jr., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, 34, 203-256.

probablemente los más utilizados en este ámbito dada su presencia en la mayoría de los paquetes comerciales de espectrofotómetros y su versatilidad, ya que han sido empleados con éxito en la determinación del tamaño de multitud de sustancias discretas o supramoleculares, como cajas de coordinación, complejos organometálicos o polímeros.³⁹¹

$$D_t = \frac{kT}{\pi\eta r_h} \quad (3)$$

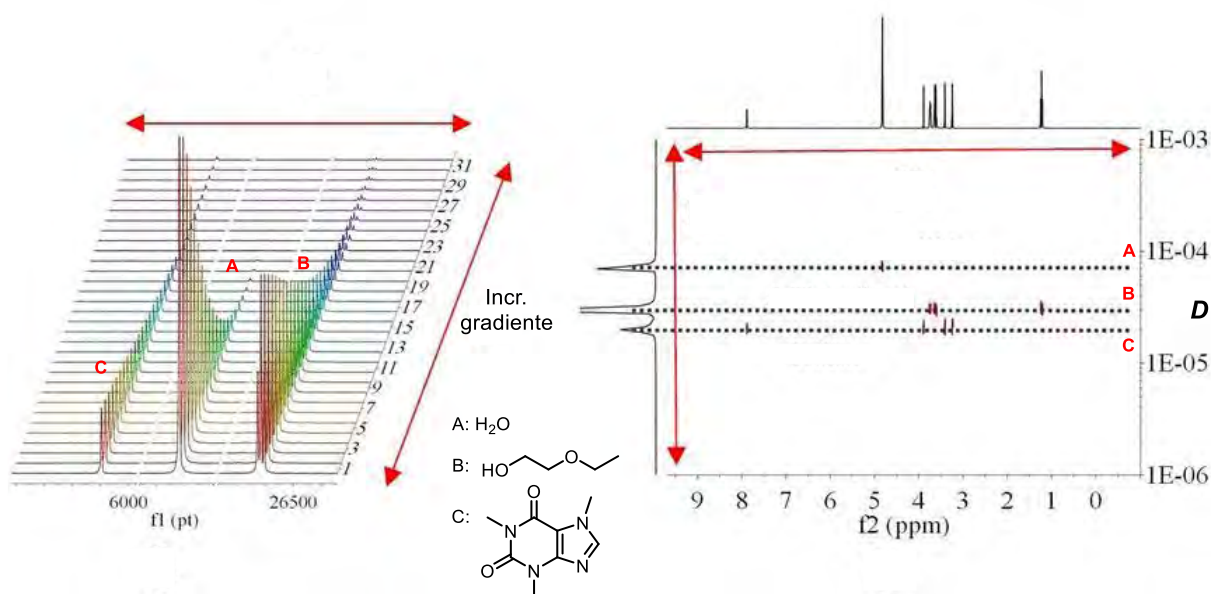


Figura 80. Representación esquemática de un experimento de DOSY sobre una muestra que contiene tres sustancias (A, B y C) de diferente peso molecular. A la izquierda se muestra la diferencia en la intensidad del decaimiento de la señal de cada especie a lo largo del gradiente de pulsos en función de su tamaño, lo que se traduce en los diferentes valores de difusión obtenidos (derecha) para las señales de cada especie.

A nivel experimental, esta técnica consiste en someter a la muestra a un gradiente pulsado de campos magnéticos, de tal manera que se vaya produciendo un decaimiento de la intensidad de las señales a lo largo del experimento, cuya magnitud depende directamente del tamaño de cada especie en disolución. Las especies de bajo peso molecular, con radios hidrodinámicos pequeños, difunden muy rápido en disolución, por lo que su decaimiento será más abrupto que en el caso de moléculas de mayor tamaño y migración más lenta. Este hecho se ejemplifica en la Figura 80, en la que se puede observar un decaimiento muy acusado en las señales de la molécula de H₂O en comparación con las de la cafeína. De esta manera, esta técnica es muy útil a la hora de trabajar con mezclas de compuestos, ya que si estos no interaccionan entre sí en disolución (migran independientemente), todas las señales de una misma molécula presentarán el mismo coeficiente de autodifusión (D_t) a la vez que cada molécula difundirá en una línea diferente en el espectro de DOSY (Figura 80, derecha). Por el contrario, si existe una interacción entre dos moléculas diferentes en disolución (por ejemplo, la formación de un complejo supramolecular), ambas moléculas estarán “pegadas” y por tanto difundirán de manera conjunta en el seno de una disolución, por lo que las señales de los protones de ambas especies se

³⁹¹ L. Avram, Y. Cohen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 586-602.

localizarán en la misma línea de difusión. Además, hay que destacar que para especies que están en equilibrio rápido en la escala de tiempo de esta técnica de RMN, donde se observa una única señal que representan una media ponderada entre las diferentes especies en equilibrio, el valor de difusión observado será la media ponderada de las difusiones de todas las especies presentes en el equilibrio.³⁹¹

Una vez atendidas estas consideraciones previas, procedimos a la realización de los experimentos de DOSY con las muestras que se han discutido a lo largo de este capítulo. Mediante esta técnica deseábamos corroborar las tendencias de agregación propuestas en base a los experimentos ¹H RMN, así como cuantificar el tamaño de las diferentes especies supramoleculares en equilibrio. Con el objetivo de lograr una robustez adicional en nuestros experimentos, que permitiese la comprobación directa de los tamaños entre muestras analizadas en condiciones diferentes,³⁹² decidimos emplear una molécula adicional, que fuese inerte con respecto a los procesos de agregación presentes en nuestros CPs y, por tanto, actuase como patrón interno. Decidimos que esta molécula fuese el *tetrakis*-(trimetilsilil)silano (TMSS) cuyos valores de difusión son constantes y conocidos en bibliografía,³⁹³ de tal manera que el conocimiento de sus datos de difusión facilitase el cálculo de los radios hidrodinámicos de nuestras “muestras problema” de una manera más rápida y precisa.³⁹⁴ Además, debido a la relación entre el tamaño del disolvente (o mezclas de disolventes) empleado y el de las moléculas estudiadas, así como de la desviación morfológica de alguna de las especies con respecto del modelo esférico, decidimos emplear la ecuación de Einstein-Stokes corregida Ec. 4, la cual incluye parámetros como c ³⁹⁵ y f_s ,³⁹⁶ que corrigen las desviaciones en los dos aspectos previamente comentados, respectivamente (ver Parte Experimental, Sección 1.5).

$$D_t = \frac{kT}{c(r_{sol}, r_H)f_s(a, b)\pi\eta r_h} \quad (4) \rightarrow \frac{D_{muestra}}{D_{TMSS}} = \frac{c(TMSS)f_s(TMSS)r_{TMSS}}{c(muestra)f_s(muestra)r_{muestra}} \quad (5)$$

De esta forma, es posible relacionar la difusión de la muestra y del patrón interno como se muestra en la Ec. 5, lo que permite eliminar parámetros de la ecuación como la viscosidad del disolvente empleado (η). Como se ha comentado con anterioridad, todos los datos del numerador son conocidos,³⁹³ mientras que los valores de c y f_s pueden obtenerse mediante la estimación de las dimensiones de las moléculas bajo estudio. Por todo esto, si experimentalmente (Figura 81) se puede determinar el cociente entre la difusión de la muestra y la del patrón interno TMSS, sería posible calcular directamente el radio hidrodinámico de la especie en equilibrio.

³⁹² Las medidas de difusión pasan por ser bastante sensibles y variar notablemente con factores tales como pequeñas variaciones en los disolventes (viscosidad) u otros factores ambientales (pequeñas impurezas de elevado peso molecular, temperatura, etc.)

³⁹³ D. Zuccaccia, A. Macchioni, *Organometallics* **2005**, 24, 3476-3486.

³⁹⁴ A. Macchioni, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia, D. Zuccaccia, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 479-489.

³⁹⁵ H.-C. Chen, S.-H. Chen, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 5118-5121.

³⁹⁶ G. Li, J. X. Tang, *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **2004**, 69, 61921. F. Perrin, *J. Phys. Radium.* **1936**, 7, 1-11.

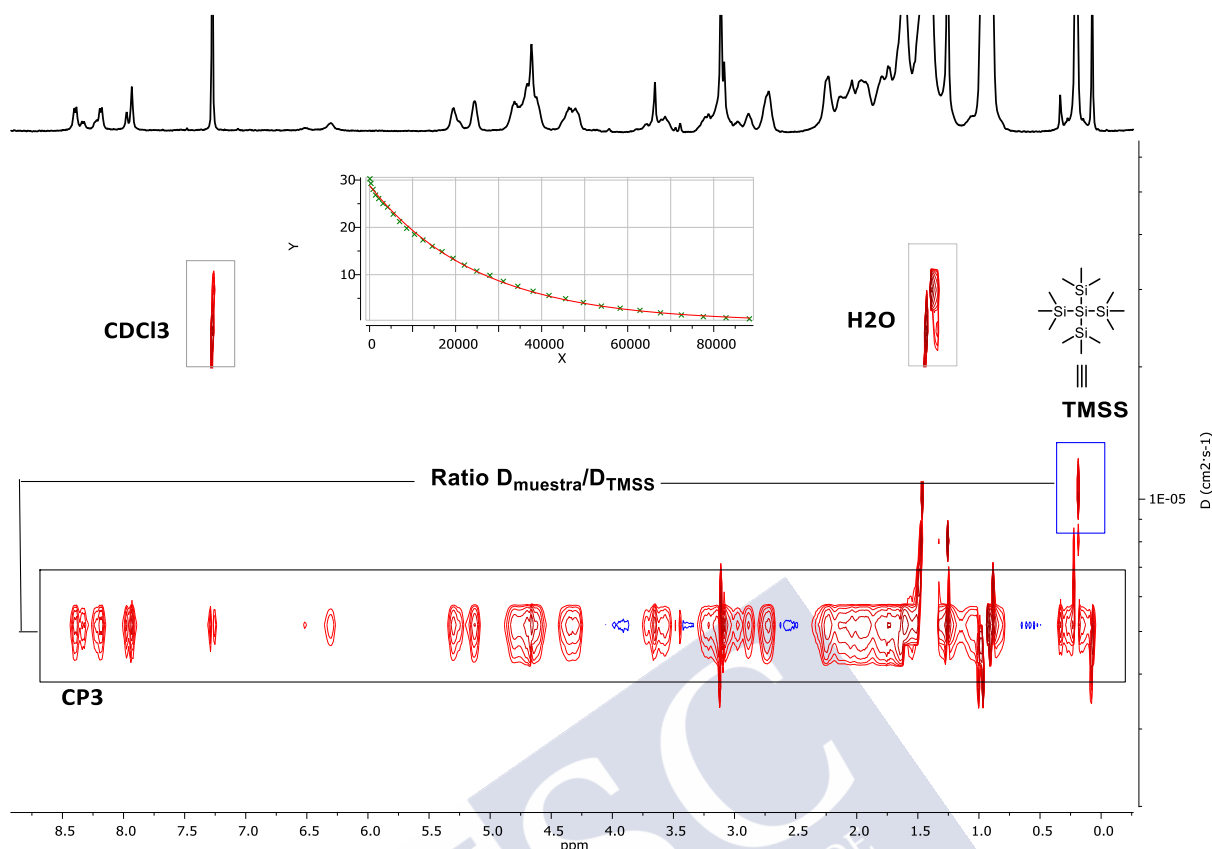


Figura 81. Ejemplo de experimento DOSY llevado a cabo con **CP3** en una mezcla 1% MeOH d_3 /CDCl₃ en presencia del patrón interno TMSS. En la parte superior se muestra el decaimiento monoexponencial en la intensidad de los picos de la muestra, que garantiza la fiabilidad del experimento.

Los resultados obtenidos por DOSY corroboran por completo nuestras observaciones iniciales. En el caso del equilibrio entre **CP3** y **NT3** (círculos rojos conectados en la Figura 82) se puede apreciar un aumento en el tamaño promedio de las especies en disolución a medida que aumenta la concentración (de 9.4 a 10.6 Å) derivado del desplazamiento del equilibrio hacia la especie agregada **NT3**. El hecho de que el incremento no sea muy notable (en torno al 10-15% en el valor de r_h) al aumentar la concentración tiene sentido, ya que la dimerización a través del ciclotetrapéptido presenta un valor de K_a bajo que se traduce en un número de agregación³⁹⁷ pequeño en este rango de concentraciones. En el momento en el que a este sistema se le añade una pequeña porción de MeOH, el valor de r_h disminuye en más de una unidad, evidenciando el menor tamaño de **D3** (cuadrado rojo en la Figura 82), la especie presente en estas condiciones, frente a los agregados nanotubulares. Por otro lado, para los sistemas heterodiméricos se llevaron a cabo medidas sobre muestras inéditas hasta este momento, como las que presentan una relación subestequiométrica de **CP4** frente a **CP3**. Al variar esta relación, es posible que se produzca (al menos en términos estadísticos) la inserción en el nanotubo final de más de dos unidades de **CP3** (como en el caso de **NTV3-4**) antes del bloqueo del crecimiento por parte de **CP4**. Estas muestras darían lugar pues a nanotubos de Venturi con más de una zona estrecha en su estructura, que se refleja en los experimentos de DOSY con un incremento

³⁹⁷ S. S. Pochapsky, H. Mo, T. Pochapsky, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2513-2514.

notable del valor de r_h (1.7 Å) cuando se pasa de una relación 1:1 a una relación 1:2 o 1:3 entre **CP4** y **CP3** (línea punteada en Figura 82). El hecho de que no exista mucha diferencia entre ambos experimentos subestequiométricos se razona nuevamente considerando el valor de K_a del ciclotetrapéptido, que desemboca en un moderado número de agregación y, por tanto, el sistema se aleja del resultado estadísticamente esperado (inserción de hasta 6 unidades de **CP3** antes del bloqueo, derivadas de la formación de 3 dímeros con baja afinidad en el experimento 1:3).

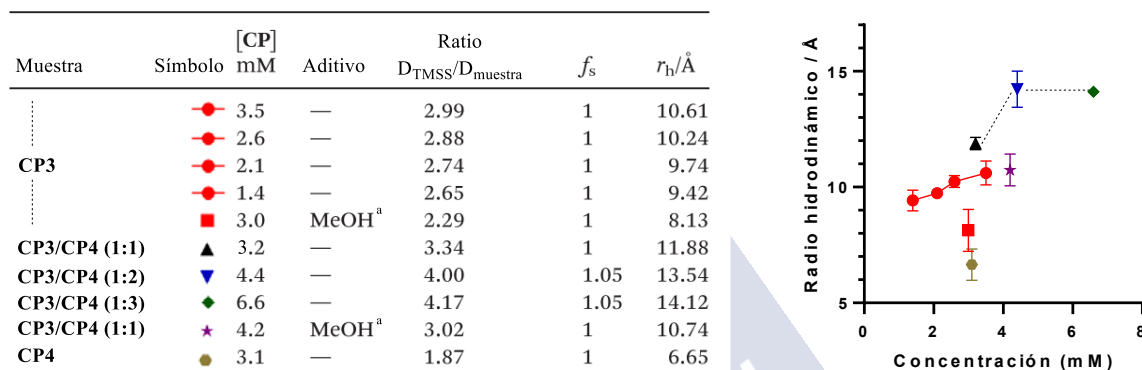


Figura 82. Resultados obtenidos para los diferentes experimentos de DOSY llevados a cabo en CDCl_3 con las muestras indicadas. a) Se utilizó un 1% de $\text{MeOH } d_3$ como co-disolvente.

En base a todos estos resultados, queda demostrada la versatilidad de este sistema supramolecular, con el que hemos exhibido la posibilidad de realizar apilamientos columnares compuestos por un número variable de CPs de diferente diámetro interno, tanto covalente como supramolecularmente unidos. De esta manera, se han preparado: nanotubos de elevado peso molecular, nanotubos de Venturi compuestos por 6 (**NTV3-4**) o más (ratios subestequiométricos entre **CP3** y **CP4**) anillos ciclopeptídicos apilados, agregados supramoleculares con forma de embudo (**D3-4**) e incluso dímeros con forma de cápsula que presentan una zona ancha en la parte media y extremos estrechos (**D3**).³⁹⁸ Creemos que este tipo de sistemas, si se amplía ligeramente el diámetro interno de la parte estrecha, podrían tener aplicaciones interesantes en campos como el transporte transmembranar, ya que dichas constricciones podrían actuar como los filtros de selectividad presentes en algunas proteínas transportadoras naturales. No obstante, a nivel sintético esto supone un reto importante, ya que habría que encontrar un sistema que, aunque fuese más ancho, siguiese presentando una cierta capacidad para modular su comportamiento, lo que evitaría su precipitación instantánea tras ser sintetizado (Figura 78).

³⁹⁸ A. Fuertes, H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *Nanoscale* **2017**, 9, 748-753.



Capítulo II

Nuevos transportadores de membrana basados en α,γ -ciclopéptidos





Capítulo II: Nuevos transportadores de membrana basados en α,γ -ciclopéptidos

Tras los buenos resultados obtenidos con la estrategia de la funcionalización del esqueleto peptídico de diferentes ciclopéptidos que permite llevar a cabo su modificación post-sintética, decidimos explotar la versatilidad de la aproximación de Fukuyama para preparar nuevas moléculas con propiedades inéditas hasta la fecha. Como ya se ha comentado en la Introducción, los CPs presentan numerosas ventajas como plataforma sintética, ya que su preparación se puede acometer siguiendo un diseño modular, con una topología perfectamente definida dada la información codificada en su propia secuencia aminoacídica. De esta manera, factores como el tamaño del esqueleto peptídico (número y tipo de aminoácidos que lo definen), sus propiedades externas (disposición radial de las cadenas laterales de los α -Aas) y, por último, la modificación de las entradas a la cavidad de los dímeros (incorporación de cadenas alquílicas sobre el átomo de nitrógeno de los γ -Aas), demostrada con éxito en el Capítulo I de esta memoria, hacen de estas moléculas candidatos privilegiados para la resolución de problemas biotecnológicos, dada la sencillez que presentan para abordar estudios sistemáticos de estructura-actividad, por ejemplo.

En base a los antecedentes presentados en la Introducción, decidimos embarcarnos en el reto de diseñar nuevos agentes transportadores de membrana, tratando de realizar una aproximación sistemática al desarrollo de diferentes CPs que sean capaces de transferir diferentes analitos hidrofílicos de interés biológico, como por ejemplo iones inorgánicos, a través de una bicapa lipídica.

La capacidad de los CPs para actuar como transportadores de membrana se conoce desde hace más de dos décadas.²⁸⁴ Inicialmente, se diseñaron *D,L*- α -CP que eran ricos en residuos hidrofóbicos, como Leu o Trp, para que se produjese una interacción favorable con las cadenas grasas de los fosfolípidos que favoreciese el autoensamblaje molecular y la formación de canales transmembranosos. Estudios posteriores han desvelado la existencia de diferentes modos de interacción con las membranas en función de la carga de estas y del tipo de Aas que acompañe a los residuos hidrofóbicos previamente comentados.³⁹⁹ Dado que la cavidad interna, decorada por los grupos amida que forman la red de enlaces de hidrógeno, es parcialmente hidrófila, se produce el tránsito interno de pequeños analitos polares que presenten un tamaño compatible con el de la cavidad del nanotubo,^{285,286,400} los cuales no podrían fluir de un lado a otro de la membrana en ausencia de estos nanotubos. Posteriormente, se prepararon otros ciclopéptidos de carácter anfífilico (mayormente hidrofóbicos, pero con regiones polares) en los cuales la morfología de los agregados supramoleculares que se formaban en contacto con la membrana era diferente (Figura 83). Estos nuevos péptidos, para evitar el contacto entre los sectores hidrofílicos con el interior de la bicapa, adoptaban estructuras tipo barril β o incluso una disposición paralela al plano de las membranas (conocido como modelo de mosaico o alfombra). Estos péptidos han sido utilizados con éxito como moléculas citotóxicas²⁷³ o

²⁸⁴ M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301-304. N. Rodríguez-Vázquez, H. L. Ozores, A. Guerra, E. González-Freire, A. Fuertes, M. Panciera, J. M. Priegue, J. Outeiral, J. Montenegro, R. García-Fandiño, M. Amorín, J. R. Granja, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2647-2661.

³⁹⁹ M. Danial, S. Perrier, K. Jolliffe, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2464-2473.

²⁸⁵ J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

²⁸⁶ J. Sánchez-Quesada, H. S. Kim, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506.

⁴⁰⁰ M. Engels, D. Bashford, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9151-9158.

²⁷³ J. T. Fletcher, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4008-4013.

antimicrobianas,²⁷⁴ ya que normalmente su autoensamblaje sobre las bicapas lipídicas promueve un incremento en la permeabilidad de las membranas y una pérdida de la homeostasis celular, derivada del transporte descontrolado de iones.

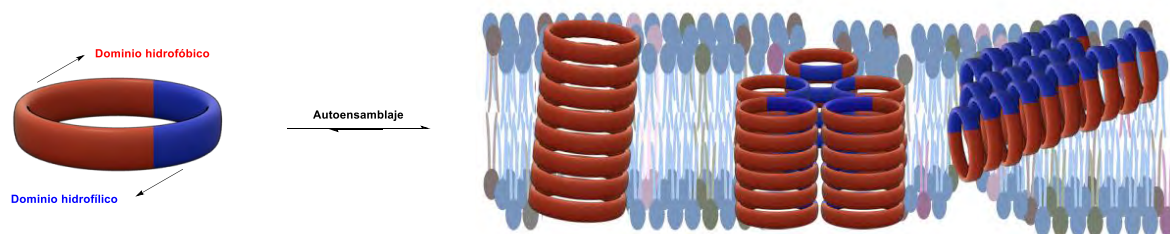


Figura 83. Representación de los diferentes modos de autoensamblaje de los nanotubos peptídicos en bicapas lipídicas según su estructura. De izquierda a derecha: inserción directa de CPs puramente hidrofóbicos para dar un canal transmembranal, formación de una estructura tipo barril β y modelo de interacción tipo alfombra paralelo a la membrana, siendo estos dos últimos modos de unión característicos de péptidos anfifílicos.

En nuestro grupo de investigación, en los últimos años se ha utilizado esta aproximación para obtener CPs precursores de canales transmembranales.⁴⁰¹ Inicialmente, se usaron α,γ -CPs ricos en residuos hidrofóbicos que combinaban un número diferente de α - y γ -Aas (Figura 84). Estos estudios demostraron mediante ensayos en membranas planas⁴⁰² y de fluorescencia en liposomas, junto con estudios computacionales, que el transportador más eficiente a la hora de transportar iones alcalinos y alcalinotérreos era un octapéptido, concretamente el c -[(*L*-Ach-*D*-Trp)₃-*L*-Ach-*D*-Gln]. Se pudo concluir que la aparición de múltiples niveles de conductancia podía deberse a la presencia de canales formados por un número diferente de péptidos cíclicos en el nanotubo (fenómeno conocido como *gating*). Los resultados no mostraron una selectividad particular para ninguno de los cationes estudiados, donde la conductancia se pudo relacionar directamente con la movilidad relativa de las diferentes especies en disolución,⁴⁰³ salvo en el caso del ion voluminoso Cs^+ . Esta observación se atribuyó a que la proyección de los metilenos del anillo de Ach hacia la cavidad interna dificultaba el tránsito de los analitos más voluminosos, que debían migrar preferentemente solvatados. En cuanto a los otros péptidos, el α,γ -ciclohexapéptido c -[(*D*-Ach-*L*-Trp)₂-*D*-Ach-*L*-Gln] parecía tener una cavidad interna demasiado pequeña, mientras que el $3\alpha,\gamma$ -ciclooctapéptido (Figura 84, izquierda) presentó una tendencia elevada a destruir las membranas lipídicas, seguramente debido a sus

²⁷⁴ S. Fernández-López, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado; J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452-455. W. S. Horne, C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxon, M. Amorín, M. R. Ghadiri, G. R. Nemerow, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5145-5153. V. Dartois, J. Sánchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. R. Granja, C. Gritzen, D. Weinberger, M. R. Ghadiri, T. R. Parr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3302-3310. L. Motiei, S. Rahimpour, D.A. Thayer, C.-H. Wong, M. R. Ghadiri, *Chem. Commun.* **2009**, 3693-3695.

⁴⁰¹ R. García-Fandiño, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

⁴⁰² E. Zakharian, *Methods Mol. Biol.* **2013**, 998, 109-118.

⁴⁰³ G. Eisenman, R. Horn, *J. Membr. Biol.* **1983**, 76, 197-225.

mayores dificultades para conseguir una conformación plana y poder autoensamblarse en este entorno hidrofóbico.²⁵⁰

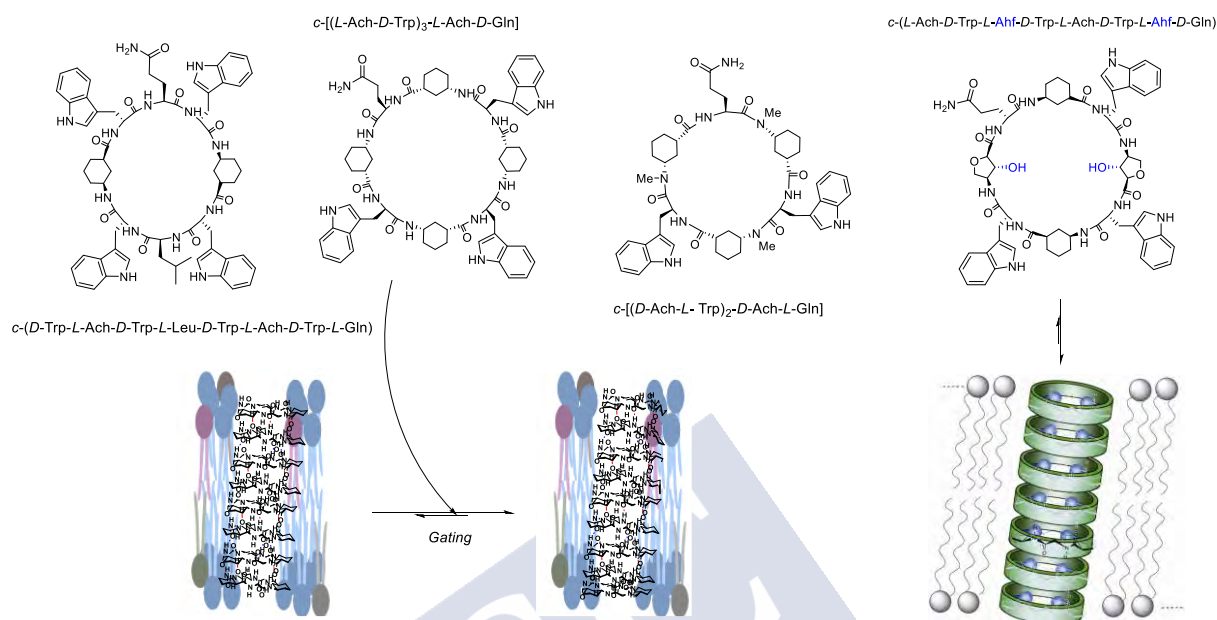


Figura 84. Diferentes α,γ -CPs utilizados en nuestro grupo de investigación como precursores de canales de membrana.

Más recientemente, con el objetivo de dotar a este tipo de nanotubos de algunas de las características que poseen los sistemas transportadores naturales, como por ejemplo la selectividad, se llevó a cabo un nuevo diseño en el cual se utilizaban γ -Aa funcionalizados en su posición β .⁴⁰⁴ Este grupo debería quedar proyectado hacia el interior de la cavidad interna y, por tanto, los nanotubos resultantes tendrían propiedades diferentes a las de sus análogos de Ach. En esta línea, se preparó el *c*-(L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Gln) (Figura 84, derecha), que incorpora dos residuos de ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (Ahf). Desafortunadamente, al llevarse a cabo estudios de transporte de protones y de rotura de membranas en liposomas, se pudo observar que este péptido propiciaba la liberación de un fluoróforo que estaba confinado en el interior de las vesículas (ver a continuación), confirmando la destrucción parcial de las bicapas. Esto puede deberse al carácter anfipático de este CP, resultado de un plegamiento similar al observado para los modelos diméricos, que le confiere propiedades detergentes.⁴⁰⁵

A la vista de todos estos resultados, decidimos desarrollar una nueva estrategia para abordar el transporte de iones, ya que hasta la fecha las estrategias estudiadas se habían basado en la formación de nanotubos peptídicos transmembranales. Para ello, pensamos que un sistema

²⁵⁰ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

⁴⁰⁴ N. Rodríguez-Vázquez, *Diseño, síntesis y estudio de α,γ -ciclopeptidos que contienen γ -aminoácidos funcionalizados en el carbono β* (Tesis Doctoral), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (**2016**).

⁴⁰⁵ N. Rodríguez-Vázquez, M. Amorín, I. Alfonso, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4504-4508.

dimérico permitiría abordar de forma más sencilla un estudio sistemático sobre los efectos que tienen diversas modificaciones estructurales en la actividad transportadora. Estos péptidos precursores de dímeros (que incorporan grupos alquílicos unidos a su esqueleto peptídico, *N*-alquilados) se podrían preparar mediante una aproximación sintética convergente en disolución, la cual presenta ventajas frente al crecimiento aminoácido a aminoácido de la síntesis en fase sólida, mediante la cual se suelen sintetizar los CPs precursores de nanotubos. Además, la metodología descrita en el capítulo anterior para la *N*-funcionalización del Acp permitiría la introducción de las cadenas apropiadas en la vertical del núcleo dimérico. Los péptidos resultantes de esta estrategia podrían emplearse para el descubrimiento de nuevos transportadores con una mejor selectividad y versatilidad que los ejemplo propuestos hasta la fecha. El abanico de posibilidades que permite esta aproximación a la hora de realizar modificaciones en la estructura es inmensamente mayor que si se utilizasen únicamente CPs precursores de nanotubos (Figura 83). No obstante, hay que tener en cuenta que renunciando a la aproximación de los nanotubos se restringe en gran medida la capacidad de formar canales de membrana que imiten a proteínas transportadoras presentes en la naturaleza. Por tanto, hay que considerar otros modos de acción que mantengan la actividad transportadora pese a no ser capaces de formar poros permanentes en las bicapas lipídicas (Figura 85).

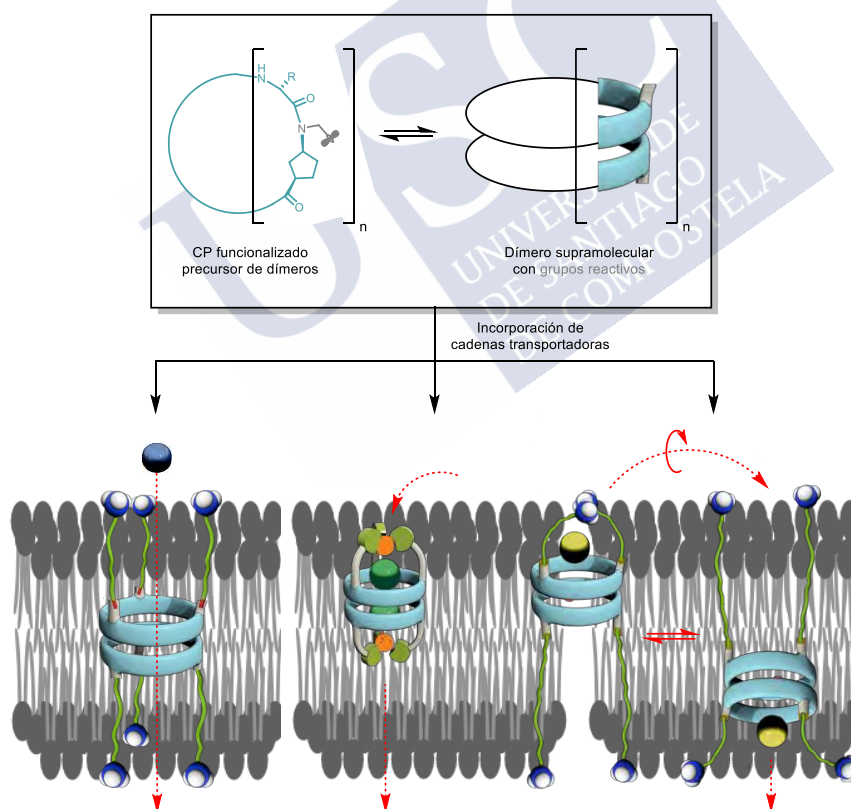


Figura 85. Propuesta de modos de acción alternativos a la formación de poros permanentes en la membrana basados en una unidad dimérica de ciclopeptidos. De izquierda a derecha: formación de canales con partes flexibles y una zona central rígida, dímeros que encapsulen los analitos polares y

migren junto a ellos protegiéndolos del entorno hidrofóbico y mecanismo de tipo “lanzadera” basado en transportadores con apéndices móviles.

Como ya se ha visto en la Introducción, una estrategia recurrente a la hora de diseñar nuevos agentes transportadores de membrana reside en la utilización de uno o varios macrociclos relativamente rígidos (ciclodextrinas,³⁰⁵⁻³⁰⁷ calixarenos³⁰⁹ o éteres corona³⁰¹⁻³⁰³) que actúen como puntos de anclaje de otras subunidades más flexibles (Figura 44). Concretamente, en algunos estudios se han empleado cadenas alifáticas o de etilenglicol largas, en ocasiones decoradas en sus extremos con grupos cargados para propiciar su colocación en la parte externa (polar) de la membrana. Inspirados por estas aproximaciones, en primer lugar nos proponemos la conjugación de diferentes α,γ -CPs formadores de dímeros con cadenas de oligoetilenglicol de diferentes longitudes, cargadas positivamente en su extremo.

1. Transportadores de tipo *membrane spanner*

Como se ha descrito en la Sección 2.2 de la Introducción, el mecanismo mediante el cual estas moléculas de gran longitud que abarcan toda la membrana consiguen favorecer el transporte de iones de relevancia biológica no está completamente esclarecido.²⁹⁶ Sin embargo, es probable que su modo de acción se base en la inducción de una permeabilidad parcial en las membranas, ya sea mediante la formación de pequeños nanoporos transitorios que alojan moléculas de agua o mediante la inducción de estrés mecánico debido a los contactos entre las dos capas de la membrana y las cadenas del *spanner*, restringiendo el movimiento independiente de ambas mitades de la bicapa.²⁹⁷ En esta línea, estudios con calixarenos que pueden adoptar una conformación de cono (comprimida) o alternada (extendida) apuntaron a que el papel de la longitud del transportador y su capacidad para abarcar ambas capas lipídicas juegan un papel clave en la actividad.^{309,406} Es por ello por lo que la modulabilidad de este parámetro debe ser una piedra angular a la hora de diseñar moléculas transportadoras que operen bajo estos principios.

Con el fin de diseñar moléculas transportadoras de este tipo, proponemos la utilización de ciclopéptidos precursores de dímeros que estén unidos covalentemente a diferentes grupos cuya función sea la de abarcar la longitud de la membrana. De esta manera, la plataforma peptídica garantizaría la orientación paralela y en el mismo plano de los grupos colgantes de ambas caras del dímero, facilitando por tanto la hipotética conformación extendida que abarque los 35-40 Å que tienen las membranas lipídicas, por norma general. Además, planteamos el uso de colgantes que contengan un grupo cargado en su extremo, para intentar fijar su contacto con la interfase membrana-fase acuosa. Puesto que a nivel biológico los lípidos más relevantes contienen grupos fosfato aniónicos en su interfase acuosa, creemos que la incorporación de grupos amonio cuaternario al final de las cadenas de oligoetilenglicol puede ser un buen punto

²⁹⁶ J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 148-175.

²⁹⁷ J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4169-4171.

³⁰⁹ N. Maulucci, F. De Riccardis, C. B. Botta, A. Casapullo, E. Cressina, M. Fregonese, P. Tecilla, I. Izzo, *Chem. Commun.* **2005**, 1354-1356.

⁴⁰⁶ L. Husaru, R. Schulze, G. Steiner, T. Wolff, W. D. Habicher, R. Salzer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 1882-1888.

de partida. Por otro lado, si estos transportadores poseen unas buenas propiedades, se podrían evaluar sus posibles actividades farmacológicas (citotoxicidad), como ya se ha hecho con otros transportadores catiónicos.³⁷⁸ En cuanto al modo de anclaje entre las cadenas que se utilizarán para abarcar la membrana y el esqueleto peptídico, utilizaremos nuevamente la cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I) (Figura 86), comúnmente conocida como *click*,³⁷⁸ ya que es preciso utilizar una reacción robusta en la última etapa sintética, y la optimización llevada a cabo durante el Capítulo I supone una ventaja clara en nuestro caso. Además, dada la gran relevancia que tienen las cadenas de PEG en campos como la bioconjugación,⁴⁰⁷ es bastante habitual encontrarse en los catálogos comerciales una abundante oferta de azido-conjugados de PEG y oligoetilenglicol de longitudes muy diversas, algo esencial para este trabajo.

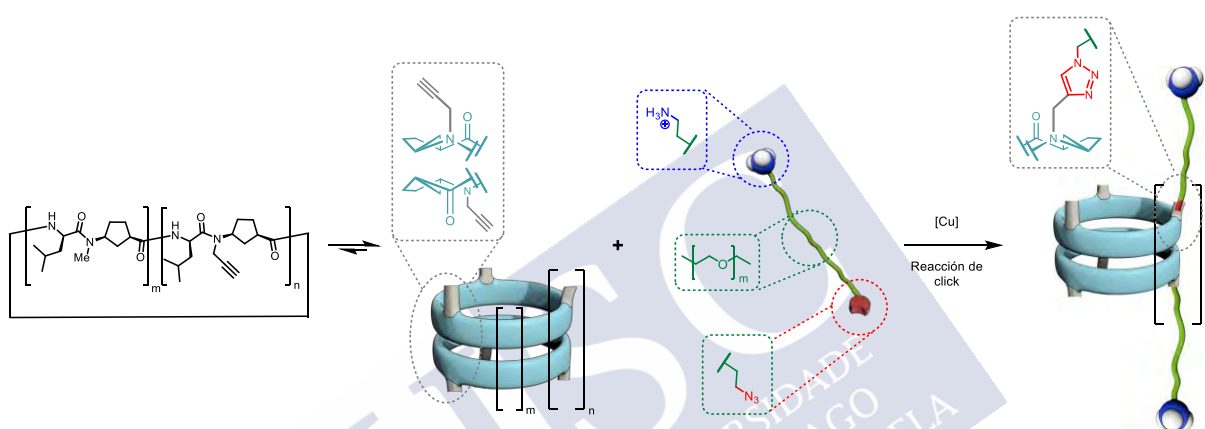


Figura 86. Representación esquemática de la estrategia llevada a cabo para la preparación de transportadores de membrana sintéticos tipo *spanner*.

En cuanto a la síntesis de la parte central de los transportadores, planteamos la preparación de varios α , γ -CP que presenten variaciones en su diámetro y en el número de puntos de anclaje de cadenas de oligoetilenglicol. Estas dos características son fácilmente modificables mediante la incorporación de un número mayor o menor de Aas en la secuencia y de grupos reactivos que permite la *N*-funcionalización (grupo propargilo), respectivamente. En esta línea nos planteamos el uso de hexapéptidos y de octapéptidos para esta tarea, que contienen, respectivamente, tres y cuatro γ -Aas en su secuencia que están *N*-alquilados. Con el objetivo de simplificar las síntesis de ambas familias de ciclos, nos propusimos utilizar como unidades constituyentes (*building blocks*) únicamente dos dipéptidos (Figura 87): el **dip2**, que contiene en su estructura un residuo de *L*-Acp *N*-metilado y **dip3**, que está *N*-propargilado. En ambos casos decidimos emplear la *D*-Leu como único α -Aa dado su carácter apolar que debe favorecer la localización del péptido en la región hidrofóbica de las membranas. Esta aproximación, aun siendo óptima en términos de esfuerzo sintético, limita el estudio de la influencia de las propiedades externas (hidrofobicidad fundamentalmente) de los CPs en su capacidad transportadora, ya que no permite la variación de las α -Aas en la primera ronda de optimización

³⁷⁸ L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, 21, 1393-1415. C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1075-1101.

⁴⁰⁷ J. Kalia, R. T. Raines, *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 138-147.

de las estructuras. Por tanto, en este trabajo nos centraremos en abordar únicamente la influencia que tienen los factores del tamaño del dímero y grado de sustitución con cadenas largas cargadas en el transporte.

Para la obtención de los CPs, estos dos dipéptidos se desprotegeron de forma ortogonal en sus extremos N- o C- terminales secuencialmente y los productos resultantes se acoplaron convenientemente para dar los diferentes tetra-, hexa- y octapéptidos lineales. El tratamiento de estas especies con hidróxido de litio en una mezcla de metanol y agua dio lugar a los correspondientes péptidos lineales en su forma de ácido libre tras la acidificación del medio de reacción. Estos fueron posteriormente tratados con TFA en diclorometano, lo que permitió liberar el extremo N-terminal dando lugar a las correspondientes sales de trifluoroacetato. Los macrociclos derivados de los péptidos lineales desprotegidos se obtuvieron mediante los protocolos (*N*-TBTU, DIEA, CH_2Cl_2) descritos en el Capítulo I de esta memoria (Figura 70). De esta forma se obtuvieron los α,γ -ciclohexapéptidos **CP5**, **CP6** y **CP7**, que contienen 3, 1 y 2 grupos propargilo, respectivamente, y los α,γ -ciclooctapéptidos **CP2**, que posee 2 grupos propargilos en extremos opuestos del anillo, y **CP11**, que posee los 4 γ -Acp *N*-propargilados. Renunciamos a la utilización de ciclotetrapéptidos por su escaso diámetro interno y baja constante de asociación,^{408,237237} y a ciclos más grandes ya que su mayor complejidad sintética no parecía compensar, *a priori*, las propiedades que esperábamos obtener del incremento del tamaño del anillo. Considerábamos que, en caso de que el transporte se diese a través de la cavidad interna de un dímero, los anillos de ocho miembros tendrían un diámetro interno suficiente para acomodar los iones típicamente estudiados y no pensamos que fuesen a existir diferencias sustanciales entre la incorporación de cuatro o cinco cadenas de oligoetilenglicol.

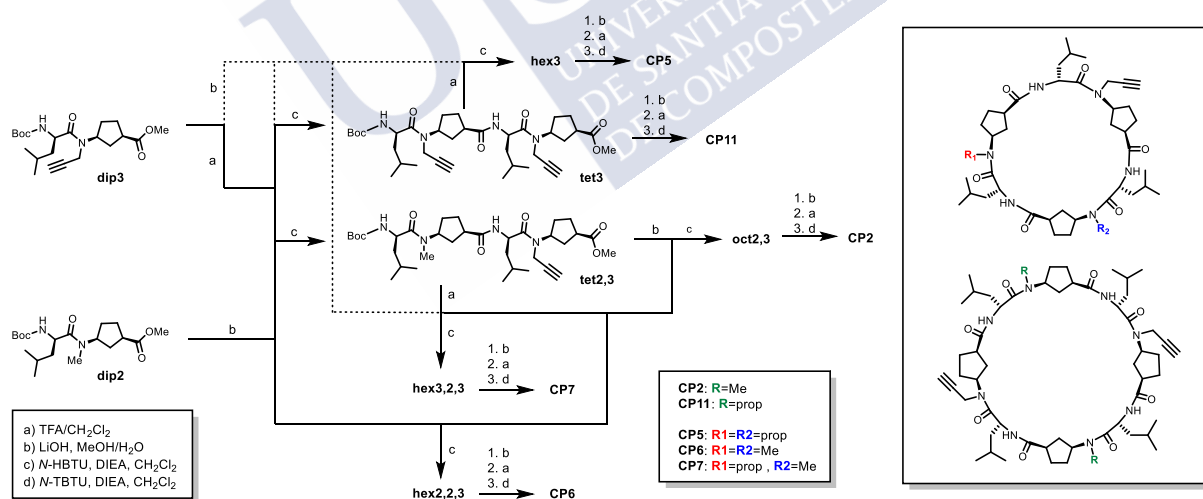


Figura 87. Ruta sintética hacia los diferentes CPs utilizados como precursores de transportadores de membrana.

⁴⁰⁸ La constante de asociación (K_a) calculada en disolventes apolares (CDCl_3) supone una buena referencia para compararla con la que hipotéticamente presentarían en el interior de la bicapa lipídica.

²³⁷ M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684. M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Heterocycles* **2006**, 67, 575-583.

También nos planteamos estudiar el efecto de la longitud de las cadenas de oligoetilenglicol y de la presencia de otros grupos funcionales en el interior de la cadena que modifiquen su hidrofilia. En todos los casos se propone incorporar una sal de amonio cuaternario en el extremo terminal más alejado del péptido, como ya se ha comentado previamente. El primer ligando seleccionado (**L**), que cuenta con 35 átomos entre los grupos amonio y azida (44 Å en su forma extendida) se preparó mediante la protección del compuesto comercial $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{11}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ con cloruro de tritilo en medio básico. Esta protección fue necesaria para poder llevar a cabo el posterior acoplamiento con el CP, ya que las diferentes condiciones estudiadas para la reacción de acoplamiento no permitieron conversiones satisfactorias usando el sustrato comercial con el grupo amino libre. Además, preparamos otros dos colgantes de longitud menor, **S** e **I**, que presentan 21 y 24 átomos de longitud (25-28 Å aprox.). Estos alargadores contienen en su estructura grupos amida además de las unidades de etilenglicol y los extremos de amina primaria y azida terminal. La fuente comercial de estos alargadores es el ácido 8-(*tert*-butilcarbonilamino)-3,6-dioxaoctanoico (**Boc-O₂Oc-OH**) y la síntesis de ambos es análoga, con una ligera modificación en el extremo que contiene el grupo azida y que esperamos modifique ligeramente la hidrofobicidad en el interior de las bicapas. Para aislar estas cadenas más cortas, se protegió el extremo C-terminal de este aminoácido lineal mediante la formación de sendos ésteres con 3-azidopropan-1-ol (para el ligando **S**) y el 6-azidohexan-1-ol (para **I**), usando la estrategia de la doble activación de ácidos carboxílicos mediante una carbodiimida (EDC) y el hidroxibenzotriazol en medio básico. A continuación, se desprotegió el extremo N-terminal de este éster mediante tratamiento con TFA y se acopló a otra unidad de **Boc-O₂Oc-OH** utilizando *N*-HBTU en medio básico (Figura 88).

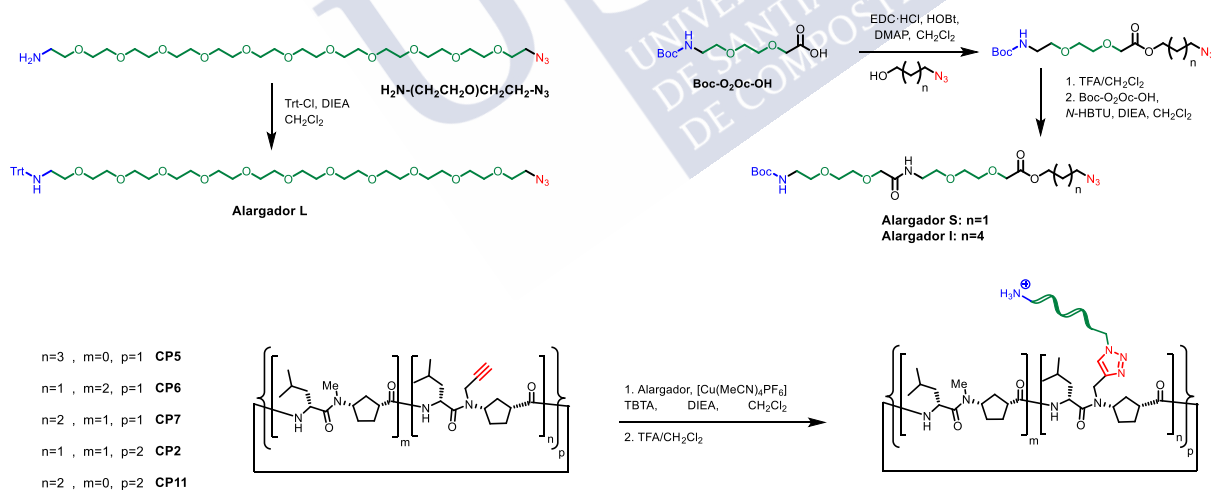


Figura 88. Arriba: preparación de los alargadores de diferente longitud, **L** (izquierda) y **S** e **I** (derecha), que contienen un grupo azida y amina protegida en cada extremo. Abajo: procedimiento de conjugación de los alargadores a los diferentes CPs mediante la reacción de *click* seguido de la desprotección de las aminas primarias mediante tratamiento con ácido fuerte.

Tras la preparación de ambos componentes, la unión entre la azida de las cadenas largas y los grupos alquino de los CPs se llevó a cabo utilizando la metodología desarrollada en el Capítulo I para la reacción de *click*. De esta forma, el complejo $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6]$ se empleó

como fuente de Cu (I), lo que permitió llevar a cabo la reacción en disolventes orgánicos (CH_2Cl_2) en presencia de DIEA y TBTA (Figura 88). Tras mezclar todos estos componentes en estrictas condiciones anhidras y en atmósfera inerte se pudieron aislar los diferentes transportadores en su forma protegida en muy buenos rendimientos (ver cuadro de la Fig. 7). El último paso en la ruta sintética consistió en la desprotección del grupo amina primaria mediante tratamiento con TFA en CH_2Cl_2 , que proporciona la forma activa de los transportadores (sales de amonio cuaternario) en rendimientos cuantitativos tras breves tiempos de mezcla. El exceso de ácido utilizado para desenmascarar la amina se elimina mediante sucesivas evaporaciones y lavados con CH_2Cl_2 , seguidos de periodos de tiempo prolongados bajo atmósfera de alto vacío (0.1 mm Hg). De esta manera, disponemos de la pequeña biblioteca de trece moléculas transportadoras con pequeñas diferencias en su estructura (Figura 89). Esperamos que el estudio sistemático de sus aptitudes para transportar iones monovalentes arroje información útil sobre la relación entre estructura y actividad, de tal manera que se puedan observar tendencias que propicien el desarrollo de nuevas generaciones de *membrane spanners* con propiedades mejoradas.

A pesar de que las membranas biológicas pueden llegar a ser morfológicamente muy diversas, si se tuviese que hacer una generalización con respecto a su estructura, se podría afirmar que el fosfolípido POPC supone una representación bastante apropiada de dichas bicapas.⁴⁰⁹ Este fosfolípido, compuesto por una cadena grasa derivada del ácido oleico (18:1) y otra del ácido palmítico (16:0), tiene una longitud aproximada (en su conformación puramente extendida) en torno a 19 Å entre el extremo de colina y el metilo terminal de sus colas hidrofóbicas (donde se produce el contacto entre las dos capas de la membrana lipídica) que se corresponde por tanto con un tamaño total en torno a 35-40 Å. Los transportadores seleccionados para este estudio poseen una longitud (considerando la distancia entre el amonio terminal y el átomo de nitrógeno del Acp), en torno a 28 Å para los derivados del alargador L, 20 Å para los de I y 18 Å para los de S, aproximadamente. Hay que tener en cuenta que estos transportadores contienen un CP que está diseñado para dimerizar en condiciones hidrofóbicas como el interior de la membrana, por lo que la estimación de la longitud total de la especie dimérica se obtiene considerando el doble de estas longitudes y la distancia intercíclica, que en los dímeros de α,γ -CPs ronda los 4.5 Å. De esta forma, claramente, los transportadores basados en L son más largos que la longitud de una bicapa lipídica estándar, mientras que S e I se encuentran más próximos a sus dimensiones. En este último caso sería necesario que los alargadores mantuviesen una conformación extendida casi en su totalidad para lograr posicionar sus grupos amonio en el entorno de los grupos fosfato de la región externa de la membrana (Figura 85, izquierda).

⁴⁰⁹ D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman, New York, 2009.

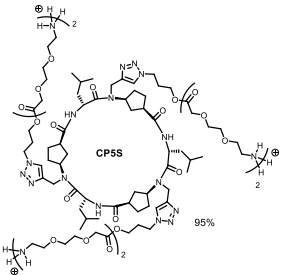
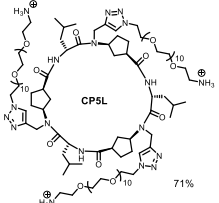
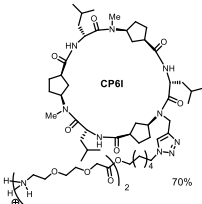
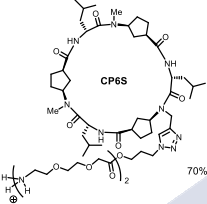
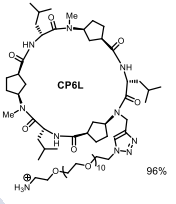
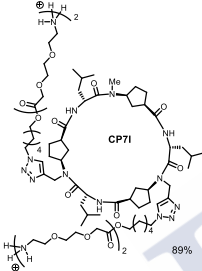
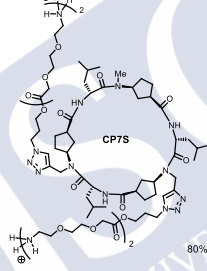
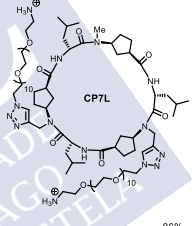
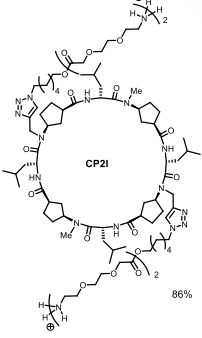
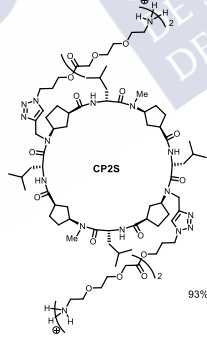
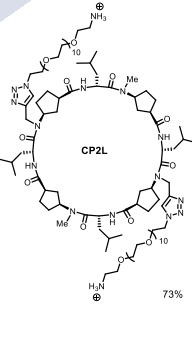
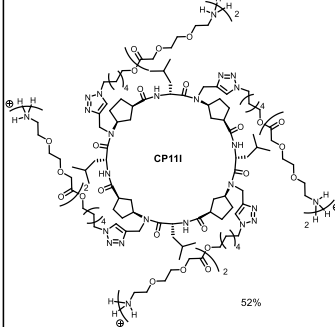
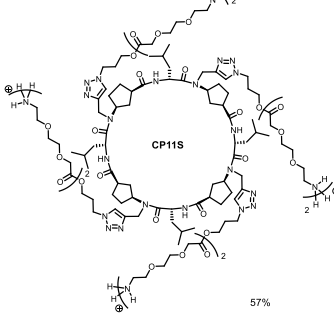
Alargador I	Alargador S	Alargador L	
			CP5
			CP6
			CP7
			CP2
			CP11

Figura 89. Qumioteca de transportadores tipo *membrane spanners* preparados.

A la hora de evaluar su capacidad transportadora, planteamos, en primer lugar, llevar a cabo experimentos en bicapas lipídicas modelo como las de los liposomas. Esta robusta metodología permite la preparación de una gran variedad de tipos de vesículas con diferentes tamaños, composición lipídica y que encapsulen diferentes disoluciones acuosas en su interior.⁴¹⁰ De esta manera, es posible introducir en el interior de estas entidades sondas fluorescentes que respondan a un estímulo en particular, como el pH,⁴¹¹ su propia concentración,⁴¹² la presencia de otras moléculas⁴¹³ (*quenchers*)⁴¹⁴ o determinados iones,⁴¹⁵ etc. Todo esto abre numerosas posibilidades para estudiar de manera sencilla y rápida, mediante métodos basados en la fluorescencia, el comportamiento de diferentes moléculas que se inserten en las membranas de los liposomas. De todas las opciones que ofrece la técnica de la fluorescencia, pensamos que lo más sencillo para iniciar el estudio sería evaluar la capacidad de nuestras moléculas para insertarse en una membrana y promover una rectificación en el pH de la disolución intravesicular, si existe un gradiente entre esta y la disolución extravesicular.

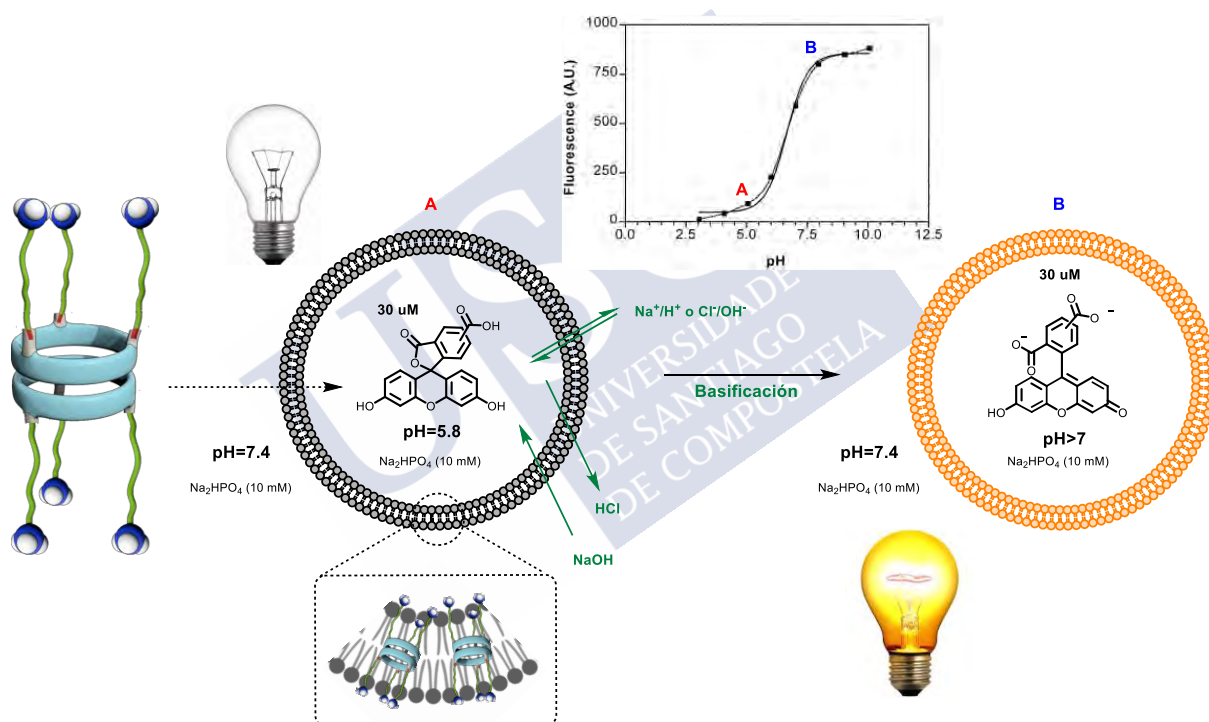


Figura 90. Representación esquemática del experimento de disipación de gradiente de pH mediante los transportadores tipo *spanner* usando CF como sonda fluorescente.

⁴¹⁰ S. Matile, N. Sakai, "The Characterization of Synthetic Ion Channels and Pores." En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Ed. Schalley, C. A.; C. A. Wiley, Weinheim, **2007**, 391-418.

⁴¹¹ J. A. Thomas, R. N. Buchsbaum, A. Zimniak, E. Racker, *Biochemistry* **1979**, *18*, 2210-2218.

⁴¹² J. N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal, W. A. Hagins, *Science* **1977**, *195*, 489-492.

⁴¹³ Y. Li, H. Zhu, O. Kuppasamy, V. Roubaud, J. L. Zweier, M. A. Trush, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2015-2023.

⁴¹⁴ T. Takeuchi, S. Matile, *Faraday Discuss.* **2009**, *143*, 187-203.

⁴¹⁵ M. Lisbjerg, H. Valkenier, B. M. Jessen, H. Al-Kerdi, A. P. Davis, M. Pittelkow, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4948-4951.

En esta línea, decidimos utilizar vesículas unilamelares grandes (con un diámetro aproximado de 100-200 nm), que contuviesen en su interior un fluoróforo cuya intensidad de fluorescencia dependiese del pH del medio. La 5(6)-carboxifluoresceína (CF) presenta una fuerte emisión a pH neutro (con una relación prácticamente lineal entre pH 6 y 8), pero emite débilmente a pH ácido (Figura 90).⁴¹⁶ Para simplificar su nomenclatura, estas vesículas se abreviarán como CF \supset LUVs (por sus siglas en inglés: *Large Unilamellar Vesicles*). El fundamento del experimento en el que se utilizan estos liposomas se basa en el cambio que se produce en la intensidad de emisión de la fluoresceína en función del pH del medio (ver curva en Figura 90). A pH ligeramente ácido (pH intravesicular inicial de 5.8) la emisión será baja. No obstante, si se suspenden estas vesículas en una disolución extravesicular con un pH mayor (7.4 en este caso) y a continuación se añade un transportador capaz de propiciar la disipación del gradiente de pH, basificando el medio interno (ver mecanismos en verde, Figura 90), se observará un incremento en la fluorescencia de la CF con el tiempo.

Para la preparación⁴¹⁷ de las CF \supset LUVs, se utilizó la metodología de hidratación de *films* de lípidos. Para ello, una disolución de fosfolípido en disolvente orgánico (CHCl₃ o EtOH) se evaporó lentamente a presión reducida (rotavapor) mientras estaba sujeta a una rotación continua, de tal manera que se formó una película fina en la superficie interna del matraz de fondo redondo en el que se lleva a cabo el proceso. En este caso, utilizamos el fosfolípido natural fosfatidilcolina, que se obtiene de la yema de huevo (abreviado como EYPC, del acrónimo de sus siglas en inglés: *Egg Yolk Phosphatidyl Choline*) y cuyo componente mayoritario (>65%) es POPC. Tras eliminar las posibles trazas de disolvente orgánico mediante la aplicación de alto vacío durante varias horas, la película se rehidrató con la disolución intravesicular, que contenía CF (30 μ M) y un tampón fosfato sódico (10 mM) a pH 5.8. Este proceso se llevó a cabo mediante la técnica conocida como *tumbling*, es decir, bajo rotación continua de la muestra. Tras este proceso, se aplicaron varios ciclos de congelación-descongelación (*freeze-thaw*), sumergiendo secuencialmente la suspensión acuosa de lípido y fluoróforo en nitrógeno líquido y un baño a 40°C. La finalidad de estos ciclos es la de transformar la mezcla de vesículas que se forman espontáneamente en vesículas unilamelares, que son las más adecuadas para este experimento. A continuación, se hizo pasar la dispersión de vesículas unilamelares a través de una membrana porosa con un orificio específico (extrusión), concretamente 100 nm en este caso, que permite homogeneizar el tamaño de la población de vesículas a ese diámetro concreto. Finalmente, la muestra se purificó mediante una cromatografía de exclusión por tamaños, cuya finalidad principal es retirar del medio todo el exceso de fluoróforo que no haya quedado atrapado en el seno de los liposomas. Por último, se recogió la fracción de CF \supset LUVs, tras su elución mediante buffer intravesicular sin fluoróforo, en un volumen conocido, de tal manera que se obtiene una dispersión de liposomas con una concentración aproximada de 6.6 mM de lípido.

El protocolo del experimento en el fluorímetro consiste en dispersar una alícuota de la suspensión de CF \supset LUVs en la disolución tampón extravesicular (10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) en una cubeta de fluorescencia termostatizada a 24°C y con agitación magnética. A continuación, se mide la emisión a 510 nm de la CF (λ_{exc} = 493 nm) en función del tiempo. A los 50 s desde el inicio del experimento se añaden alícuotas de las disoluciones de los diferentes transportadores en DMSO (concentraciones desde 10 mM hasta 10 μ M). En todos los casos, el volumen de la disolución de DMSO añadida supuso el 1% del volumen total utilizado en el

⁴¹⁶ S. Massou, *Biochemical Education* **2000**, 28, 171-173

⁴¹⁷ V. P. Torchilin, V. Weissig, *Liposomes*, Oxford University Press, **2003**.

experimento, por lo que la concentración del transportador en la cubeta (la que se indica en las figuras posteriores) es 100 veces menor a la de la disolución stock. Con esta pequeña porción, el efecto del disolvente orgánico añadido se limita a un incremento residual de en torno al 5% en la fluorescencia. Tras monitorizar el aumento de la fluorescencia con el tiempo, a los 400 s se añadió un detergente (TritonX-100) que rompe las membranas lipídicas liberando el contenido de las vesículas y basifica súbitamente el entorno de la CF, de tal manera que se puede tomar el valor de fluorescencia máximo tras este punto y utilizarlo para normalizar los datos. Además de las medidas con los transportadores, llevamos a cabo una serie de controles para comprobar si únicamente los alargadores desprotegidos (con la azida terminal) tenían alguna capacidad transportadora por sí solos, al igual que los CPs con alquinos, antes de realizar ninguna *click* sobre ellos (Figura 87).

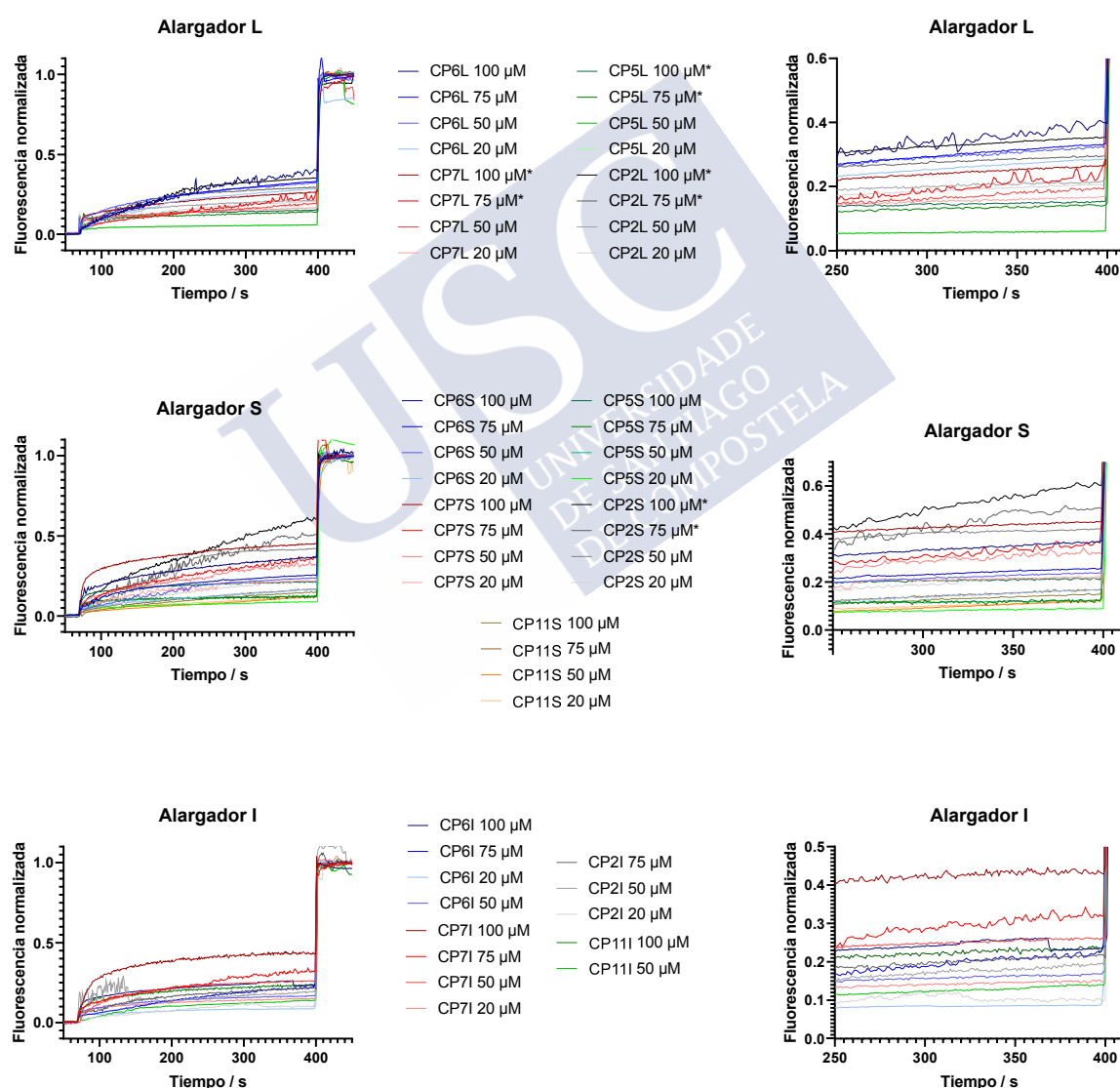


Figura 91. Resultados obtenidos para el transporte de H^+/OH^- (basificación de CF encapsulada en LUVs) mediante los transportadores tipo *spanner* (a la derecha se muestra una ampliación de la región 250-400 s). Las trazas acompañadas de un asterisco (*) indican la aparición de turbidez en la cubeta de

fluorescencia al término del experimento, causada por la baja solubilidad del transportador en el medio experimental.

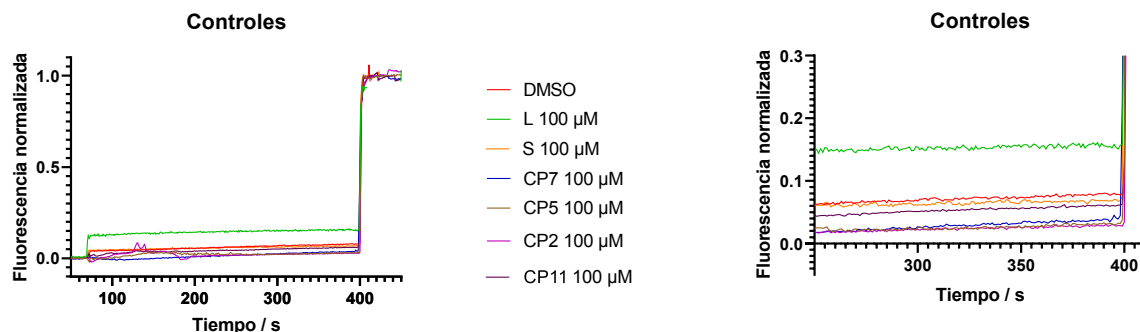


Figura 92. Controles del experimento de basificación de CF (añadidos como disolución en DMSO). En la parte derecha se muestra la ampliación de la región 250-400 s.

Como se puede observar en la Figura 91, la capacidad de transporte de protones de estos compuestos es bastante limitada, ya que, si excluimos los compuestos que presentaron problemas de solubilidad a concentraciones altas (por ejemplo, para el caso de **CP2S**, donde se puede observar este fenómeno por la forma de las trazas y el ruido que presentan), en ningún caso se superó un 40% de actividad en el rango de μM medio-bajo, que supone una concentración relativamente elevada para este tipo de compuestos transportadores, si atendemos a ejemplos previos descritos en bibliografía^{418,349}. Además, en el experimento control con la cadena más larga (Figura 92) se pudo observar que esta presenta una ligera actividad, por lo que, en contexto, los resultados de la primera serie serían aún más modestos.

En cuanto a las tendencias generales, se observa que un gran nivel de sustitución (3 o 4 cadenas de etilenglicol en los derivados de **CP5** y **CP11** respectivamente) no es favorable para el transporte, como indican la baja actividad de las trazas en tonos verdes y naranjas de las gráficas de la Figura 91. Para las series de **S** e **I**, los compuestos más activos (excluyendo **CP2S** por su solubilidad limitada que puede dar lugar a artefactos en las medidas) son los derivados de **CP7**, que tienen dos cadenas unidas. Para el caso de **L**, la mejor actividad la presenta **CP6L**, con únicamente una cadena. El hecho de que un grado de funcionalización menor del anillo ciclopeptídico funcione mejor con el PEG grande, mientras que con alargadores más cortos se requiera el doble de cadenas ancladas podría indicar que la cantidad neta de unidades de etilenglicol tiene un papel más relevante que el número de cadenas en sí. No obstante, como ya se ha comentado con anterioridad, el exceso de grupos etilenglicol parece restringir la capacidad transportadora si hay muchas cadenas, muy probablemente debido a su baja solubilidad en el medio lipófilo de la membrana. Desafortunadamente a pesar de que las cadenas de PEG se supone que incrementan la solubilidad de este tipo de moléculas con núcleos muy apolares en medios acuosos, en nuestro caso no ha sido así con alguno de los transportadores, y por ello

⁴¹⁸ R. Li, O. V. Kulikov, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2009**, 6092-6094. P. K. Eggers, T. M. Fyles, K. D. D. Mitchel, T. Sutherland, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1050-1058. J. K. W. Chui, T. M. Fyles, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3622-3634.

³⁴⁹ P. Gale, J. Davies, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 2497-2519.

sacar conclusiones claras para todas las series no ha sido posible. En cuanto a la influencia del tamaño del anillo, parece que los ciclohexapéptidos se comportan mejor que los ciclooctapéptidos, posiblemente debido a la solubilidad de **CP2S** y **CP2L**. Estos muestran actividades similares a concentraciones altas a los transportadores **CP6L** y **CP7S**, pero el hecho de que al acabar el experimento se observe una considerable turbidez en la cubeta de fluorescencia nos hace tomarnos estos resultados con un cierto escepticismo.

Para caracterizar en detalle las aptitudes transportadoras este tipo de sistemas, generalmente se recurre a la representación de curvas de dosis-respuesta⁴¹⁰ que se pueden ajustar a la ecuación de Hill (Ec. 6).⁴¹⁹ Esta permite obtener parámetros como el coeficiente de Hill (n), que ofrece información sobre la estequiometría (o cooperatividad) de la especie transportadora, o la EC_{50} , que se corresponde con la concentración a la cual el transportador desempeña el 50% de su actividad máxima (Y_{max}).⁴²⁰ Dados los modestos resultados obtenidos para estos sistemas, únicamente llevamos a cabo este análisis en profundidad para la molécula **CP7S**, con un estudio detallado en un rango de concentraciones mayor para ajustar de manera realista a la ecuación de Hill, mientras que para el resto de los transportadores se realizó una estimación usando el valor del control de DMSO (6%) como transporte mínimo (Y_0). Los datos aproximados se presentan en la Figura 93, en donde se representa el % de transporte a 395 s (Y_{395}) frente a la concentración de la muestra.

$$Y = \frac{Y_0 + (Y_{max} - Y_0)}{[1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n]} \quad (6)$$

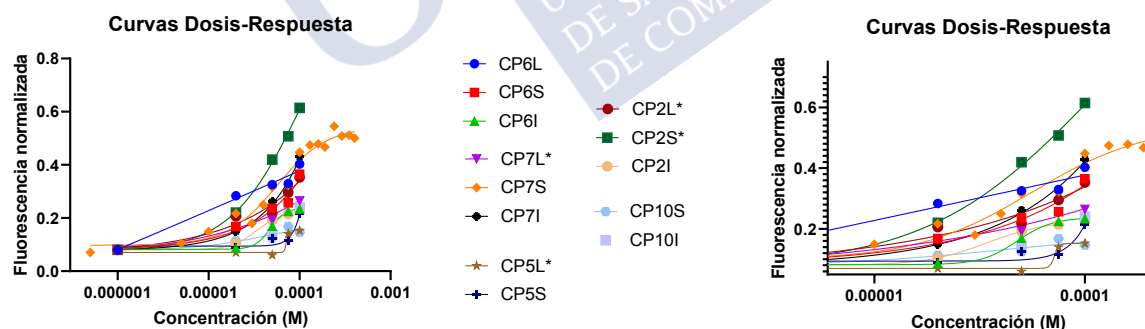


Figura 93. Curvas de dosis respuesta que permiten estimar los parámetros de la Ec de Hill (Ec. 6) para cada transportador (a la derecha se muestra la ampliación del gráfico de la izquierda).

⁴¹⁹ A. V. Hill, *Biochem. J.* **1913**, 7, 471-480.

⁴¹⁰ S. Matile, N. Sakai, "The Characterization of Synthetic Ion Channels and Pores." En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Ed. Schalley, C. A.; C. A. Wiley, Weinheim, **2007**, 391-418.

⁴²⁰ S. Matile, A. V. Jentzsch, J. Montenegro, A. Fin, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2453-2474.

Pendant	L		S		I	
CP	EC ₅₀	Y _{max}	EC ₅₀	Y _{max}	EC ₅₀	Y _{max}
CP6	>10 μM^a	>40% ^a	40 μM^a	35%	48 μM	24%
CP7	25 μM^a	26%	56 μM	48%	>45 μM^a	>40% ^a
CP5	>70 μM^a	15%	>80 μM^a	22%		
CP2	45 μM^a	35%	>30 μM^a	>50% ^a	35 μM	22%
CP11			>70 μM^a	17%	>55 μM^a	24%

Tabla 1. Resultados obtenidos para el análisis de las trazas de transporte con la ecuación de Hill. El superíndice ^a indica que el dato fue estimado debido a que no había suficientes puntos en la curva o que no se ha llegado a la concentración que presenta el transporte máximo (Y_{max}) por la baja solubilidad del transportador.

Para corroborar que la actividad se debía a un proceso de basificación de la disolución intravesicular y no a una liberación parcial de la CF encapsulada debido a la pérdida de integridad o rotura de las membranas de los liposomas, decidimos realizar un nuevo experimento de transporte.⁴¹² En esta ocasión, se prepararon unas vesículas de idéntica composición lipídica y tamaño que las anteriores, pero variando la concentración de CF intravesicular, aumentándola desde 30 μM hasta 50 mM. A esta concentración el fluoróforo se encuentra autoapagado debido a la interacción entre diferentes moléculas, un fenómeno que se observa por encima de 10 mM.⁴¹² De esta forma, si se suspenden las vesículas en una disolución extravesicular a pH 7.4 y tras la adición del transportador se produce una pérdida de la integridad estructural en la membrana liposomal la fluorescencia aumentará. Esto se debe a la aparición de orificios que permitan la salida del fluoróforo (normalmente se define a este fenómeno mediante el término inglés *leakage*), cuya dilución en el buffer extravesicular producirá un incremento en la fluorescencia (Figura 94).

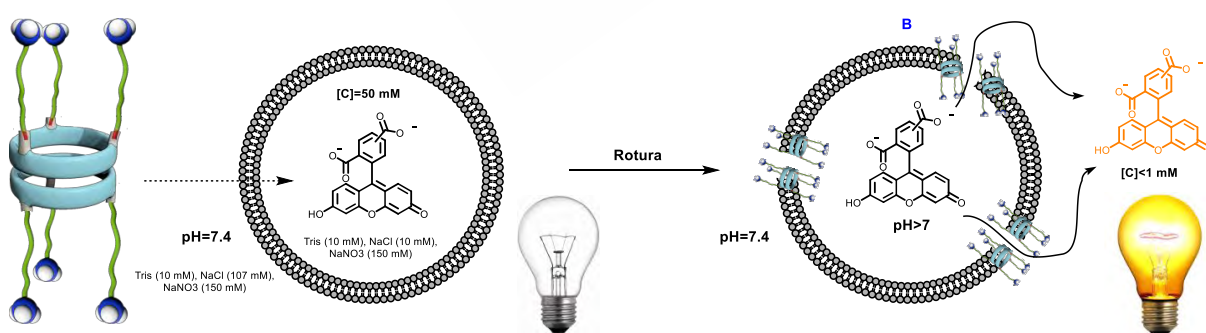


Figura 94. Representación esquemática del experimento utilizado para estudiar la integridad de las vesículas unilamellares tras la adición de los transportadores.

Tras llevar a cabo este experimento (ver Parte experimental, Sección 2.2.4 para los detalles de la preparación de las vesículas/muestras y el protocolo de medidas) con los transportadores desprotegidos en forma catiónica, se pudo comprobar que el único compuesto

que presentaba una actividad detergente reseñable en este experimento (Figura 95, traza morada), y por tanto causaba en cierta medida la liberación de CF, era **CP7S**, que mostraba una liberación de en torno a un 20%. Por lo tanto, volviendo la vista a la Tabla 1, se debe hacer la puntualización de que el valor de Y_{\max} para este transportador de 48% se debe, en parte, a esta actividad lítica y, en realidad, su actividad efectiva como transportador de H^+/OH^- se ve mermada en un 40%.

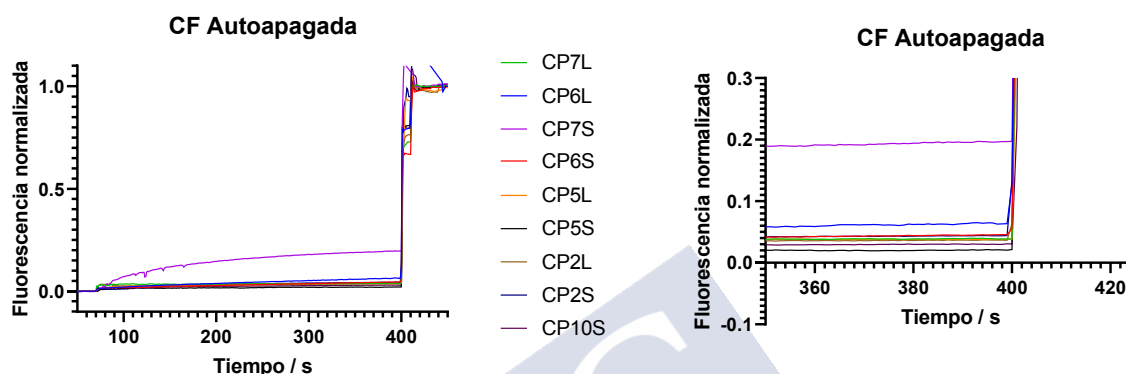


Figura 95. Trazas obtenidas en el experimento con vesículas de CF autoapagada (50 mM) y los diferentes transportadores a una concentración de 30 μ M en cubeta.

Dadas las pobres capacidades de este tipo de estructuras con cadenas de oligoetilenglicol actuando como alargadores de la estructura ciclopeptídica dimérica (especialmente en cuanto a sus valores de EC_{50}) decidimos cambiar el diseño de las moléculas transportadoras con el objetivo de explorar otros mecanismos de acción.

2. Transportadores tipo ionóforo/carrier

Puesto que ya se habían estudiado en el pasado sistemas ciclopeptídicos precursores de nanotubos que actúan como canales de membrana, formando un poro definido, y tras evaluar en la sección anterior el uso de alargadores conjugados a dímeros como agentes transportadores que abarquen toda la membrana, decidimos plantear el diseño de moléculas que actúen mediante un mecanismo tipo ionóforo, hasta ahora inédito en el campo de los ciclopéptidos autoensamblantes. Cabe destacar que existen muchos sistemas naturales, alguno de los cuales han sido comentados en la Introducción de esta memoria, que presentan estructuras ciclopeptídicas o depsipeptídicas (valinomicina⁴²¹ o eniatina,⁴²² por ejemplo), en las cuales se combina una cavidad hidrofílica con un exterior hidrofóbico liposoluble, por lo que la utilización de CPs como precursores de transportadores de este tipo no parece una idea descabellada. En lugar de permanecer anclados a las membranas induciendo su permeabilidad o formando poros de dimensiones nanométricas, los ionóforos se caracterizan por tener un

⁴²¹ K. Neupertlaves, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 432-442.

⁴²² A. Kart, A. Bilgili, *J. Anim. Vet. Adv.* **2008**, 7, 748-751.

comportamiento más dinámico. Esto se debe a que su capacidad transportadora se basa en la complejación de un ion en la interfase membrana externa-agua (normalmente sustituyendo su esfera de hidratación por otras interacciones con átomos que posean pares electrónicos libres), seguida de la migración conjunta de la forma complejada y finalmente la liberación del analito en la interfase membrana interna-citosol.

Para el diseño de esta nueva familia de transportadores, buscamos estructuras que pudiesen imitar en cierta medida a los ionóforos naturales, manteniendo un exterior lipofílico a la par que dotando al interior o cavidad de una cierta capacidad para complejar iones metálicos, mediante la introducción de grupos funcionales coordinantes. Concretamente, pensamos que los núcleos ciclopeptídicos previamente sintetizados seguían siendo una plataforma válida para actuar como parte central de los nuevos ionóforos, ya que constan de un exterior lo suficientemente hidrofóbico (cadenas laterales isopropílicas de la Leu y grupos etileno de los Acp) y de una cavidad anfipática la cual puede ser modificada si se incorpora algún grupo coordinante en los grupos alquino terminal.⁴²³ Consideramos la utilización de anillos de piridina anclados directamente a estos triples enlaces, ya que cuentan con un par electrónico sobre el átomo de nitrógeno cuya orientación hacia el interior de la cavidad puede ser fácilmente modificada al variar la posición relativa a través de la cual estos anillos aromáticos se unen a los CPs. De esta forma, es de esperar que en el isómero 2-etinilpiridínico (posición *orto*), este par solitario esté orientado directamente a la cavidad del dímero, mientras que el isómero de la posición 3 (*meta*), disponga el átomo de nitrógeno apuntando hacia la entrada de la cavidad, pero no hacia dentro de ella. En el caso del isómero *para*, no se cumpliría el principio de que la posición de coordinación quede recluida en el interior del dímero en ningún caso, ya que necesariamente el nitrógeno apuntará en la misma dirección, pero en sentido contrario a la cavidad. Para este tipo de transportadores contamos con la ventaja de que la plataforma peptídica garantiza un control topológico muy concreto dada su relativa rigidez en la forma dimérica, lo que abre la puerta a la utilización de más de un anillo de piridina de forma cooperativa. Por ejemplo, en los anillos basados en ciclohexapéptidos, a pesar de que el conector entre ciclopeptido y piridina presente una cierta flexibilidad, podría imaginarse que, llegado el caso, se pueda dar una conformación en la que las tres piridinas formen una tapa que cierre la cavidad (Figura 96, abajo), dando lugar a una molécula con forma cónica como los cavitandos, que a su vez puede dimerizar para dar una cápsula supramolecular que sea el ionóforo activo. En el caso de **CP11**, con cuatro grupos propargilo en su secuencia, dado el mayor diámetro interno que presenta, se hace más difícil pensar en una cooperatividad que vaya más allá de dos anillos de piridinas contiguos interactuando con un mismo analito a la vez.

Con estas premisas, decidimos sintetizar dos nuevas moléculas derivadas de la unión entre **CP5** y tres unidades de 2- o 3-yodopiridina mediante una reacción de Sonogashira,³⁷² llevada a cabo con un exceso de reactivo de piridina y en presencia de cantidades catalíticas de [PdCl₂(PPh₃)₂] y CuI, usando una mezcla de THF y Et₃N como disolvente. Este procedimiento permitió aislar los ionóforos **CP5a** (isómero *orto*) y **CP5b** (isómero *meta*) en rendimientos en torno al 50%, donde también se obtenía como subproducto en ambos casos el producto de acoplamiento de únicamente dos unidades de piridina.

⁴²³ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845. M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* **2005**, *15*, 87-92.

³⁷² K Sonogashira, Y. Tohda, N. A. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, *50*, 4467-4470.

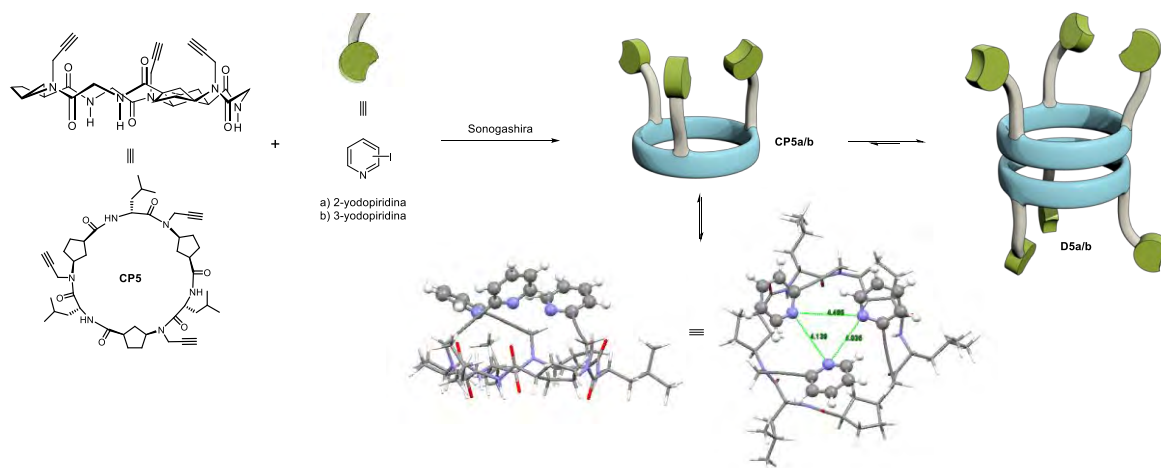


Figura 96. Representación esquemática de la estrategia sintética seguida para la preparación de **CP5a** y **CP5b** a partir de **CP5** y 2- o 3-yodopiridina, respectivamente. En la parte inferior se muestra la estructura cónica esperada para **CP5a**, que presenta todos los átomos de nitrógeno de los anillos de piridina sobre la cavidad.

La elección de preparar únicamente ciclohexapéptidos trisustituídos se basa no solo en el principio de cooperatividad, sino también en la idea de confinar al máximo la especie polar que se transporta en el interior de la cavidad, dotando al sistema dimérico de un cierre más hermético, por así decirlo, en el que los contactos entre dímero ciclopeptídico y membrana son homogéneos y siempre entre superficies hidrofóbicas. En bibliografía existen numerosos sistemas transportadores sintéticos que presentan una estructura de cavitando en la que una unidad central sirve de anclaje para varias cadenas ricas en grupos dadores/aceptores, siendo especialmente relevantes los ejemplos tripodales basados en anillos centrales de *tren*⁴²⁴ (*tris*(2-aminoetil)amina), nitrilotrimetanol,⁴²⁵ 2,4,6-trietilbencenos trisustituídos³⁵⁹ en las posiciones 1,3 y 5 o benzo-*tris*([1,3]oxazinas)³⁶⁰ conjugados con cadenas de ácido cólico, carbamatos, ureas/tioureas o amidas (Figura 51). Existen otros ejemplos en los cuales se utiliza un núcleo del que salen únicamente dos grupos funcionales, como las decalinas⁴²⁶ o los anillos aromáticos *meta*- sustituidos tipo isoftalimidas,⁴²⁷ o que incluso utilizan esteroides³⁵⁰ como puntos de anclaje.

En cualquier caso, la característica común de todos estos trabajos es que se nutren de la conformación prefijada de una tapa central que sirve como anclaje a las unidades coordinantes que actúan de manera cooperativa dando lugar a una cavidad definida con grupos coordinantes orientados de manera organizada. Con nuestra aproximación pretendemos explotar este tipo de cooperatividad, pero invirtiendo la forma de anclar las cadenas reactivas, ya que en el caso de

⁴²⁴ X. Wu, P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16508-16514.

⁴²⁵ S. K. Dey, A. Basu, R. Chutia, G. Das, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 26568-26589.

³⁵⁹ Z. Li, X. H. Yu, Y. Chen, D. Q. Yuan, W. H. Chen, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13368-13375.

³⁶⁰ A. Roy, D. Saha, A. Mukherjee, P. Talukdar, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5864-5867.

⁴²⁶ H. Li, H. Valkenier, L.W. Judd, P. R. Brotherhood, S. Hussain, J. A. Cooper, O. Jurcek, H. A. Sparkes, D. N. Sheppard, A. P. Davis, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 24-32.

⁴²⁷ X. Li, B. Shen, X. Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13676-13680.

³⁵⁰ P. R. Brotherhood, A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3633-3647.

este trabajo estarían unidas a la parte central que define el poro interno y no en el extremo de la molécula transportadora que cierra la estructura.

Tras la síntesis (Figura 96), decidimos comenzar la evaluación de las propiedades transportadoras de estos péptidos y para ello llevamos a cabo en primer lugar el experimento de disipación de un gradiente de pH con CF Δ LUVs. El protocolo de preparación de muestras y medidas es análogo al descrito en el apartado anterior.

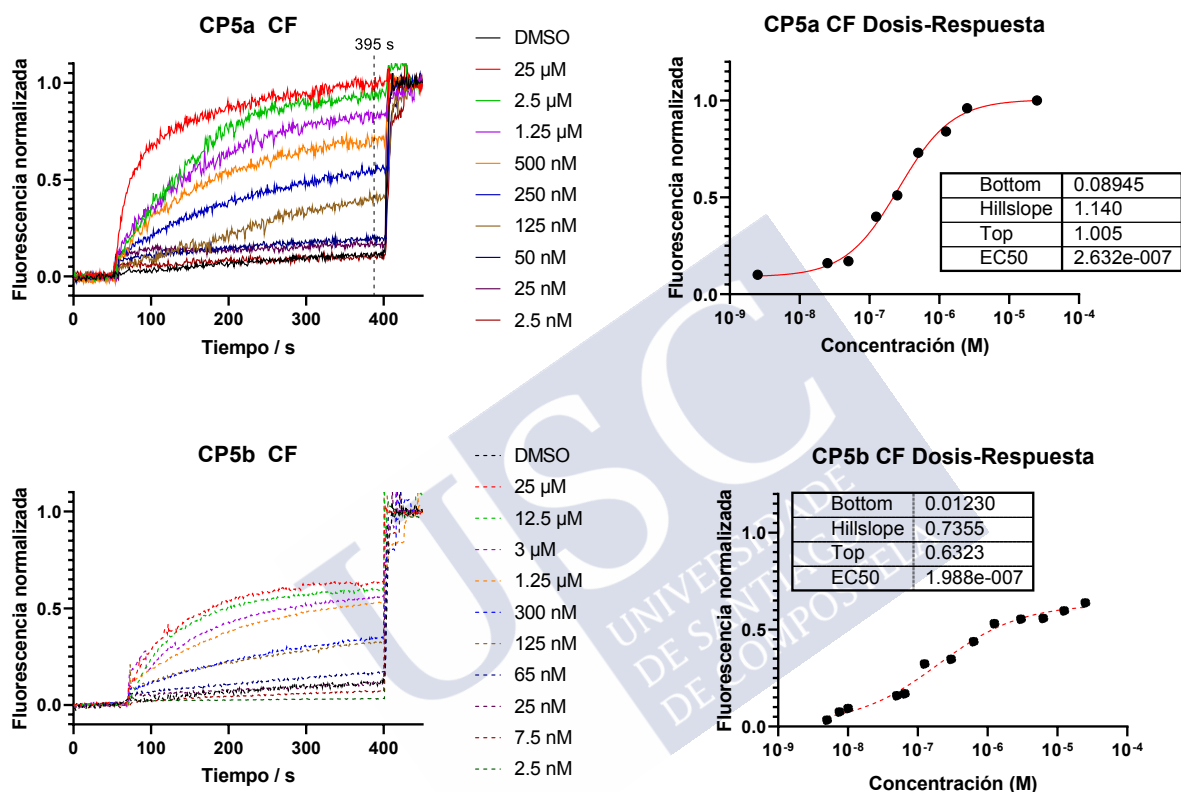


Figura 97. Trazas obtenidas en el experimento de disipación del gradiente de pH basado en CF Δ LUVs con **CP5a** y **CP5b** (izquierda). Regresiones no lineales a la curva de Hill (Ec. 6), donde se muestran los parámetros obtenidos tras el ajuste (derecha).⁴²⁸

Como se puede observar en la Figura 97, el rendimiento de estos ionóforos es notablemente superior al de los compuestos analizados en el apartado anterior. Su actividad máxima (Y_{\max}) en ambos casos aparece a concentraciones más bajas (en torno a 30 μ M en cubeta), por lo que la solubilidad de estos nuevos candidatos no supone un inconveniente, ya que en ningún caso se observó turbidez en los rangos de concentración estudiados. Si comparamos los resultados que arrojan ambos isómeros con detenimiento, se puede observar que el isómero con piridinas en *orto* **CP5a** es más activo en cuanto a la cantidad de pH que disipa, pero la tendencia se invierte en cuanto a la eficiencia a la hora de hacerlo. El primer factor se mide mediante el término Y_{\max} de la ecuación de Hill y, a la luz de los resultados

⁴²⁸ Bottom: Y_0 ; Hillslope: n ; Top: Y_{\max} .

representados en la Figura 97, a las concentraciones más altas, **CP5a** es capaz de igualar el pH intravesicular con el extravesicular en unos 350 s ($Y_{\max}=1$), mientras que su isómero *meta* se queda en un 60% de disipación del gradiente de pH. En cuanto a la eficiencia, este parámetro se mide con el término EC_{50} , el cual determina que **CP5a** es capaz de desempeñar el 50% de su actividad máxima a una concentración de 263 nM, mientras que **CP5b** lo hace a una concentración todavía más baja, con un valor muy destacable de 199 nM. Estos valores son, al menos, dos órdenes de magnitud mejores que los mejores candidatos descritos en el apartado anterior. Puesto que existe una dependencia directa entre la cantidad de vesículas que se utiliza para los experimentos y la actividad observada de las moléculas a estudiar, es habitual presentar también el resultado de EC_{50} mediante la relación que existe entre moles de transportador y moles de lípido en cada experimento. Con esta representación (ver Parte Experimental), se obtienen valores de ratios transportador:lípido de 1:2508 y 1:3320 para **CP5a** y **CP5b**, respectivamente. Este dato hay que tomarlo con prudencia, puesto que las relaciones están obtenidas a partir de una estimación de la concentración de vesículas tras el paso por la cromatografía de exclusión por tamaños y no tras una cuantificación precisa de la cantidad de fosfolípido. El protocolo que se debería realizar para esta determinación precisa es bastante complejo y está basado en métodos enzimáticos,⁴²⁹ por lo que en este caso utilizaremos esta relación molar a modo de referencia cualitativa. En cuanto al factor n , que se corresponde con la pendiente de la curva, se observa una mayor verticalidad en el caso del isómero **CP5a**, no obstante, al aproximarse ambos valores a la unidad, se puede concluir que el modo de acción se basa en una especie monomérica o en una especie supramolecular muy estable, como pudiera ser un dímero ciclopeptídico con una elevada constante de asociación. Además, se pudo comprobar que todo el pH que se disipa se debe a un transporte efectivo de H^+/OH^- , ya que el experimento de CF autoapagada no mostró ninguna actividad disruptiva de la membrana tras añadir concentraciones elevadas de estos ionóforos (Figure 10, Parte Experimental).

Dados los prometedores resultados de estos sistemas, decidimos continuar su caracterización, profundizando en el análisis de su selectividad y de su mecanismo de acción a la hora de atravesar las membranas. El siguiente paso consistió en analizar su capacidad para permeabilizar aniones, concretamente el ion cloruro (Cl^-), el cual presenta un rol fundamental a nivel biológico y, además, es el ion que presenta una mayor influencia en la aparición de enfermedades derivadas del mal funcionamiento de canales iónicos.⁴³⁰ En esta línea, también evaluamos la actividad mediante un ensayo basado en LUVs, pero en este caso, encapsulando una sonda diferente en su interior. Concretamente, preparamos vesículas de EYPC con un diámetro de 200 nm que incorporaban el nitrato de *bis-N*-metilacridinio, comúnmente conocido como lucigenina (LG), el cual se caracteriza por mostrar un perfil de fluorescencia dependiente del anión que tenga unido a su estructura aromática.^{431,415} De esta manera, si los dos aniones nitrato se sustituyen por iones halogenuro, se produce un “apagado” de su fluorescencia, lo que la convierte en una sonda muy efectiva a la hora de detectar este tipo de aniones (Figura 98).

⁴²⁹ Existen numerosos kits comerciales disponibles para determinación de fosfato, para un ejemplo reciente ver: S. Futaki *et al.*, *Nature Chemistry* **2017**, 9, 751-761.

⁴³⁰ R. Planells-Cases, T. J. Jentsch, *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1792, 173-189.

⁴³¹ B. A. McNally, A. V. Koulov, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. P. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089.

⁴¹⁵ M. Lisbjerg, H. Valkenier, B. M. Jessen, H. Al-Kerdi, A. P. Davis, M. Pittelkow, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4948-4951.

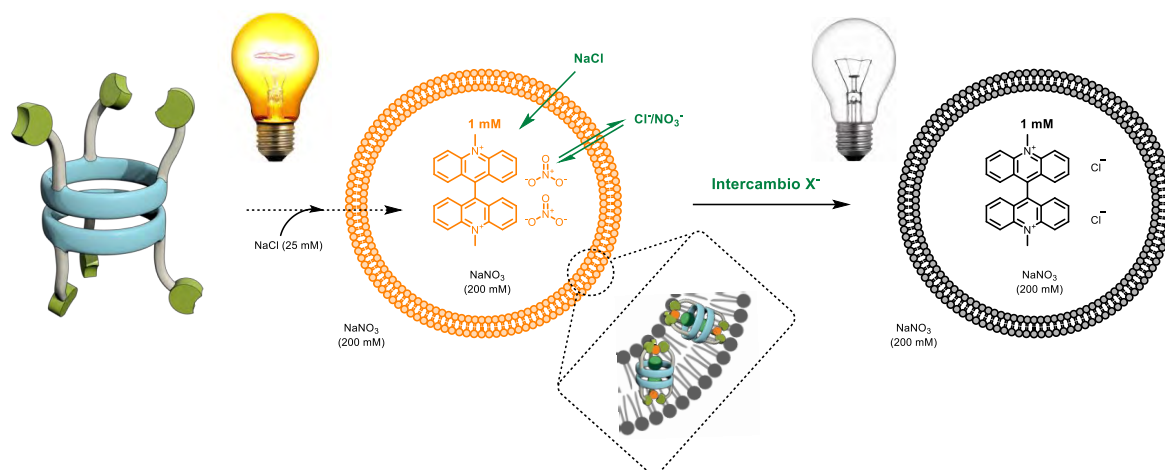


Figura 98. Esquematzación del experimento de $\text{LG} \rightarrow \text{LUVs}$ para la determinación del transporte de ion cloruro, ya sea mediante un mecanismo *symport* de NaCl o un mecanismo *antiport* de intercambio cloruro/nitrato.

Tras preparar las vesículas en presencia de una disolución acuosa que contenía NaNO_3 (intra y extravésicular), llevamos a cabo los experimentos con concentraciones variables de ambos transportadores (desde μM medio hasta pM). Experimentalmente, tras suspender una porción de dispersión de vesículas en la disolución de nitrato, se añadió al medio NaCl (a $t=50$ s), seguido de la adición de la alícuota del péptido (disuelto en $i\text{PrOH}$) tras 100s desde el inicio del experimento. En este caso, se observa la rápida caída de la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=450$ nm y $\lambda_{\text{em}}=535$ nm) hasta los 400 s, momento hasta el que se prolongaron los experimentos para permitir un buen equilibrio entre los medios intra y extravésiculares. Tras este tiempo, se añadió el detergente para utilizar el máximo alcanzado en el experimento para normalizar los datos. Por último, se realizó de nuevo el ajuste a las curvas de dosis-respuesta para analizar los parámetros de eficiencia, tal como se muestran a continuación en la Figura 99.

Como se puede apreciar, en este caso el isómero que presenta los tres anillos de piridina en *orto* es el mejor tanto en cantidad (Y_{max}) como en calidad (EC_{50}) de transporte de cloruro. Presenta un valor de EC_{50} casi cuatro veces más bajo que su análogo **CP5b**, en el rango de nM medio (45 y 170 nM, que supone ratios transportador:lípido de 1:3625 y 1:975, respectivamente). A pesar de que en bibliografía existen compuestos que presentan actividad a concentraciones sub-nanomolares (ratios inferiores a 1:250000),⁴³² estos resultados siempre han sido obtenidos mediante la preincorporación del transportador a las vesículas durante la formación de estas, por lo que todo el transportador añadido se incorpora a las membranas lipídicas. Por tanto, podemos considerar que, atendiendo a la metodología llevada a cabo, estos resultados son muy destacables, teniendo en cuenta que es preciso que el transportador se compleje, se reparta entre el medio acuoso y lipídico, migre a través de la bicapa y suelte su carga en el interior vesicular.

⁴³² C. M. Dias, H. Valkenier, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 6262- 6268. C. M. Dias, H. Li, H. Valkenier, L. E. Karagiannidis, P. A. Gale, D. N. Sheppard, A. P. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1083-1087. H. Valkenier, L. W. Judd, H. Li, S. Hussain, D. N. Sheppard, A. P. Davis *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12507-12512.

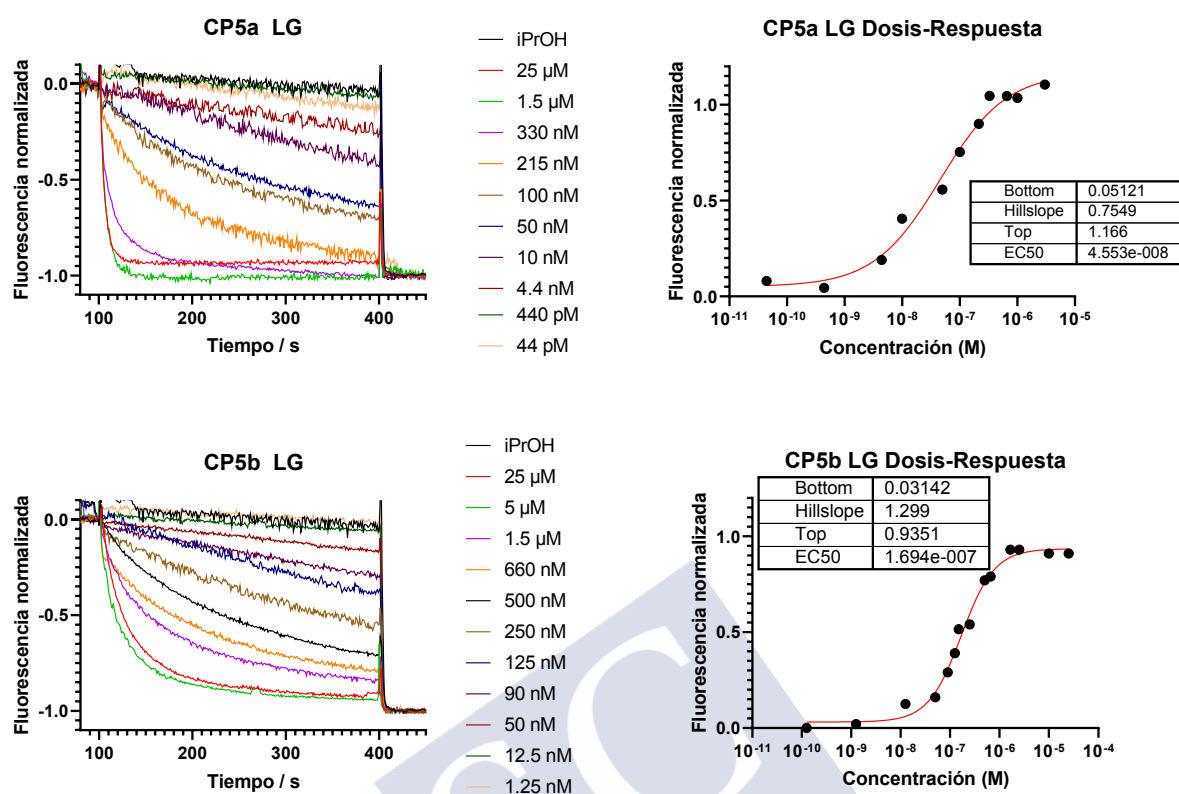


Figura 99. Trazas (izquierda) y curvas de dosis-respuesta (derecha) de **CP5a** (arriba) y **CP5b** (abajo) en el experimento de transporte de Cl⁻ en LG \supset LUVs.

A concentraciones superiores a 300 nM, **CP5a** es capaz de provocar el apagado total del fluoróforo en menos de 100 s desde su adición a la cubeta, con una cinética de transporte muy elevada. Si se analiza dicha cinética siguiendo un modelo de decaimiento exponencial en la intensidad del fluoróforo, se obtienen tiempos de vida media ($t_{1/2}$) para la especie fluorescente de 4.5, 26 y 55.5 s a concentraciones de 25, 1.5 y 0.33 μ M, respectivamente (ver Parte Experimental, Figure 9). En el caso de **CP5b**, la actividad máxima alcanza el 93% a una concentración de 5 μ M, pero la cinética es más lenta. Las curvas presentan un decaimiento de la fluorescencia mucho más suave que arrojan valores de $t_{1/2}$ de 57, 50.5 y 127 s a concentraciones de 25, 5 y 0.5 μ M, respectivamente. Nuevamente, los valores de n son similares a los del experimento previo, por lo que podemos intuir que la especie transportadora es similar en ambos casos.

El uso de este diseño de experimento para el transporte de cloruro permite además estudiar el mecanismo de transporte, ya que, para mantener la electroneutralidad en el proceso, se requiere que a la entrada del anión cloruro le acompañe la entrada de un catión sodio o bien la salida de un anión nitrato. El primer modo de acción se basa en el mecanismo *symport* que se ha descrito en la Introducción, mientras que, si lo que se observa es el segundo proceso, estaríamos frente a un proceso *antiport*.⁴¹⁰ No obstante, se conoce que el ion nitrato es bastante lipófilo, por lo que, de ser preciso, podría migrar por sí mismo para equilibrar la presión

osmótica o el balance de cargas.⁴³³ Por ello, decidimos realizar un experimento adicional en el cual sustituimos las sales intra- y extravesiculares (inicialmente NaNO_3) por sulfatos. El anión sulfato es mucho más hidrofílico y por tanto no puede atravesar la parte apolar de las membranas lipídicas por sí mismo, además de ser un anión difícil de transportar.⁴³⁴ De esta forma, si se observan diferencias en el transporte en presencia de tampón nitrato o sulfato, sería posible deducir el tipo de mecanismo, *symport* o *antiport*, mediante el cual funcionan nuestros transportadores.

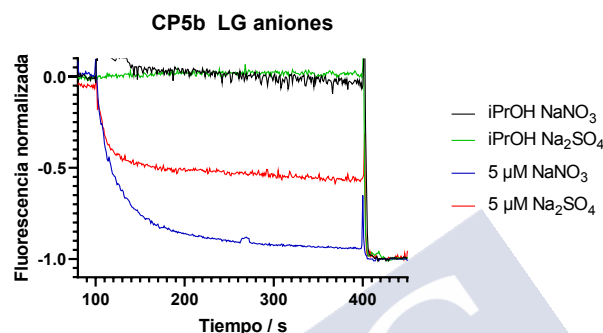


Figura 100. Trazas de transporte de **CP5b** en presencia de sales que presentan diferentes aniones.

Como se puede observar en la Figura 100, hay una diferencia notable entre ambos experimentos, donde claramente el transporte disminuye drásticamente (93% vs 55%) en presencia de sulfato en el medio. Estos resultados son consistentes con un mecanismo de cotransporte de Na^+ y Cl^- simultáneo (*symport*), ya que en presencia de nitrato este ion es capaz de aliviar la presión osmótica que se genera al introducir NaCl en los liposomas con su salida hacia el exterior. Sin embargo, en el caso del tampón sulfato, se produce un transporte inicial de similar cinética, pero, rápidamente, la entrada de más iones cloruro se ve frenada debido a que las vesículas no pueden dar salida a iones desde su interior, dada la incapacidad del ion sulfato para abandonar las vesículas por sí mismo. Si el mecanismo fuese *antiport*, no se debería observar ninguna actividad en el experimento con sulfato, ya que no existen suficientes iones nitrato que transportar al exterior en el medio intravesicular.^{433,405}

A continuación, pasamos a explorar el efecto que tenía la presencia de diferentes cationes y/o aniones en la actividad transportadora. Para este fin, se utilizaron LUVs cargadas con una nueva sonda fluorescente, la piranina o HPTS. Este fluoróforo también presenta una emisión de fluorescencia dependiente del pH, aumentando esta con el aumento del pH en el rango de 6 a 9 unidades (Figura 101, derecha).⁴³⁵ Sin embargo, el experimento de basificación de HPTS

⁴³³ Y. Yang, X. Wu, N. Busschaert, H. Furuta, P. A. Gale, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 9230-9233.

⁴¹⁰ S. Matile, N. Sakai, "The Characterization of Synthetic Ion Channels and Pores." En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Ed. C. A. Schalley, Wiley, Weinheim, **2007**, 391-418.

⁴³⁴ N. Busschaert, L. E. Karagiannidis, M. Wenzel, C. J. E. Haynes, N. J. Wells, P. G. Young, D. Makuc, J. Plavec, K. A. Jolliffe, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1118-1127.

⁴³⁵ N. R. Clement, J. M. Gould, *Biochemistry* **1981**, 20, 1534-1538.

⁴⁰⁵ N. Rodríguez-Vázquez, M. Amorín, I. Alfonso, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4504-4508.

¡Error! Marcador no definido. A. Roy, D. Saha, A. Mukherjee, P. Talukdar, *Org. Lett.* **2016**, 18, 5864-5867.

LUVs permite la variación de las disoluciones tampón intra/extravesiculares, de tal manera que se puede analizar si existe alguna preferencia (selectividad) a la hora de transportar ciertos iones inorgánicos. ⁴³⁶

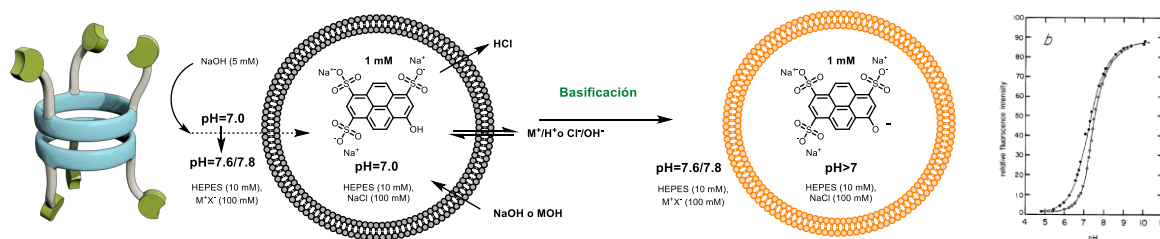


Figura 101. Esquema del ensayo de HPTS en LUVs en el que se indican los posibles mecanismos de basificación del interior de los liposomas, así como la relación entre pH e intensidad de fluorescencia para este fluoróforo (derecha).

En estos nuevos experimentos se prepararon liposomas de EYPC (100 nm) que contenían 1 mM de HPTS en 100 mM NaCl tamponado con HEPES a pH 7. A continuación, se suspendieron en el mismo medio (*buffer* HEPES pH 7) pero con diferentes tipos de sales $M^{n+}X_n$ (100 mM). De esta forma se podía investigar la influencia de los cationes usando una serie de cloruros alcalinos y alcalinotérreos, o la influencia de los diferentes aniones empleando las sales sódicas correspondientes. Para ello, transcurridos 50 s desde la dispersión de los liposomas, se basificó el medio externo mediante la adición de una disolución de NaOH (Δ pH estimado en torno a 0.8 unidades) y, a continuación (100 s), se añadió el transportador a una concentración en cubeta fija de 1 μ M en todos los casos. El aumento de la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 450$ nm y $\lambda_{em} = 510$ nm) debido a la basificación del interior de las vesículas se monitorizó hasta los 400 s, cuando se añadió TritonX-100. Los resultados obtenidos en presencia de los diferentes *buffers* extravesiculares se muestran en la Figura 102.

⁴³⁶ V. Gortea, G. Bollot, J. Mareda, A. Pérez-Velasco, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14788-14789.

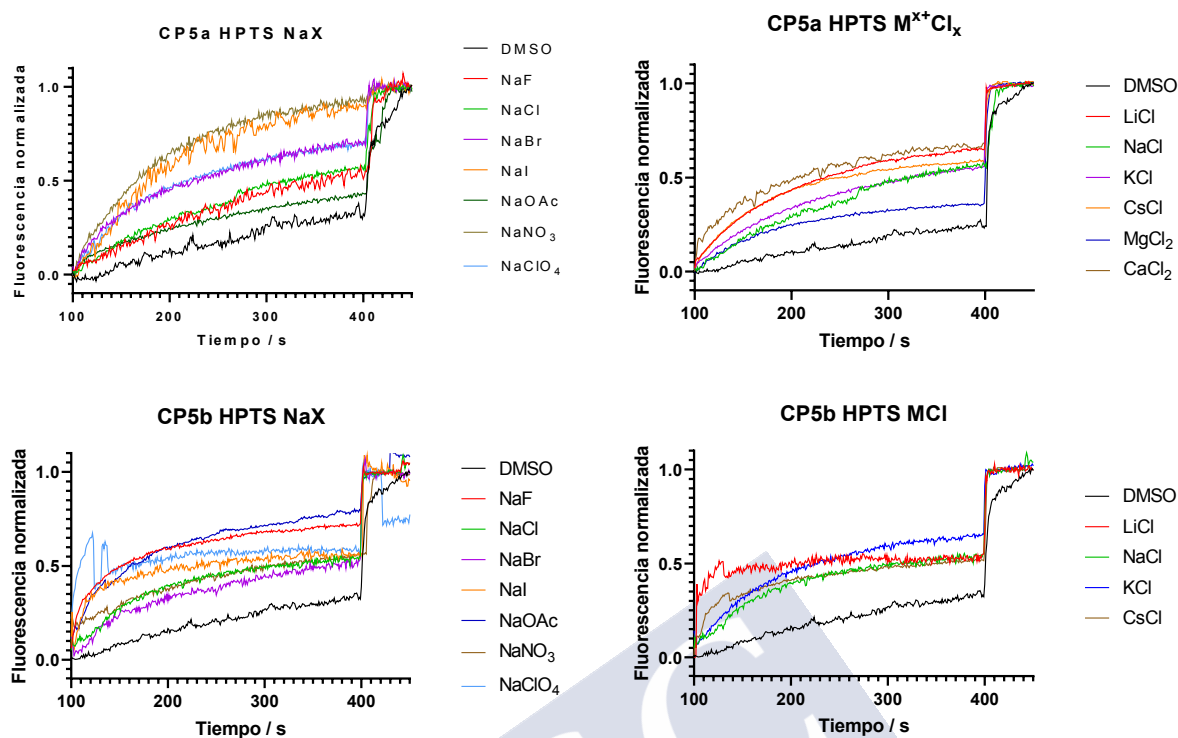


Figura 102. Diferentes trazas de transporte en el experimento de HPTS \Rightarrow LUVs obtenidas con **CP5a** y **CP5b** (1 μ M) en presencia de diferentes buffers extravesiculares. Como tiempo inicial en las gráficas (t_0) se tomó la adición del péptido (100 s) y el detergente se añadió a 400 s.

Se puede observar que existe una gran disparidad en los resultados con ambos transportadores, en donde, en términos generales, los diferentes cationes extravesiculares originan menores variaciones en el porcentaje de transporte que los aniones. Si consideramos los aniones, en el caso de **CP5a**, sobresalen los resultados de los aniones NO_3^- y I^- (rondando el 90%), mientras que para **CP5b** existe un clúster muy definido en torno al 45-50% de transporte del que solo sobresalen los iones AcO^- y F^- . Para los cationes, las diferencias se hacen más escasas, donde quizás lo más reseñable sea la diferencia con **CP5a** entre los cationes alcalinotérreos Ca^{2+} y Mg^{2+} , con un 65 y 35% respectivamente. Con el fin de poder analizar en más profundidad las tendencias observadas en este experimento, se representaron los datos de transporte normalizado frente al radio iónico (concretamente a su valor inverso) por un lado, y a la energía de hidratación de los iones, por otro (Figura 103).

Queda patente que aparecen dos tendencias claramente diferenciadas para cada uno de los isómeros, aunque también se observa que algunos datos no se ajustan bien a dichas tendencias. En el caso de **CP5a**, el transporte se incrementa en presencia de aniones grandes y polarizables, que presentan energías libres de hidratación relativamente bajas, siendo las excepciones a estas tendencias las trazas para fluoruro y perclorato. En cuanto a los cationes, la baja actividad observada para la sal de Mg^{2+} se podría explicar en base a la formación preferente del complejo $(\text{Mg}[\text{H}_2\text{O}]_6)^{2+}$, lo que dificultaría su transporte frente a otros cationes no hidratados como por ejemplo el Ca^{2+} .

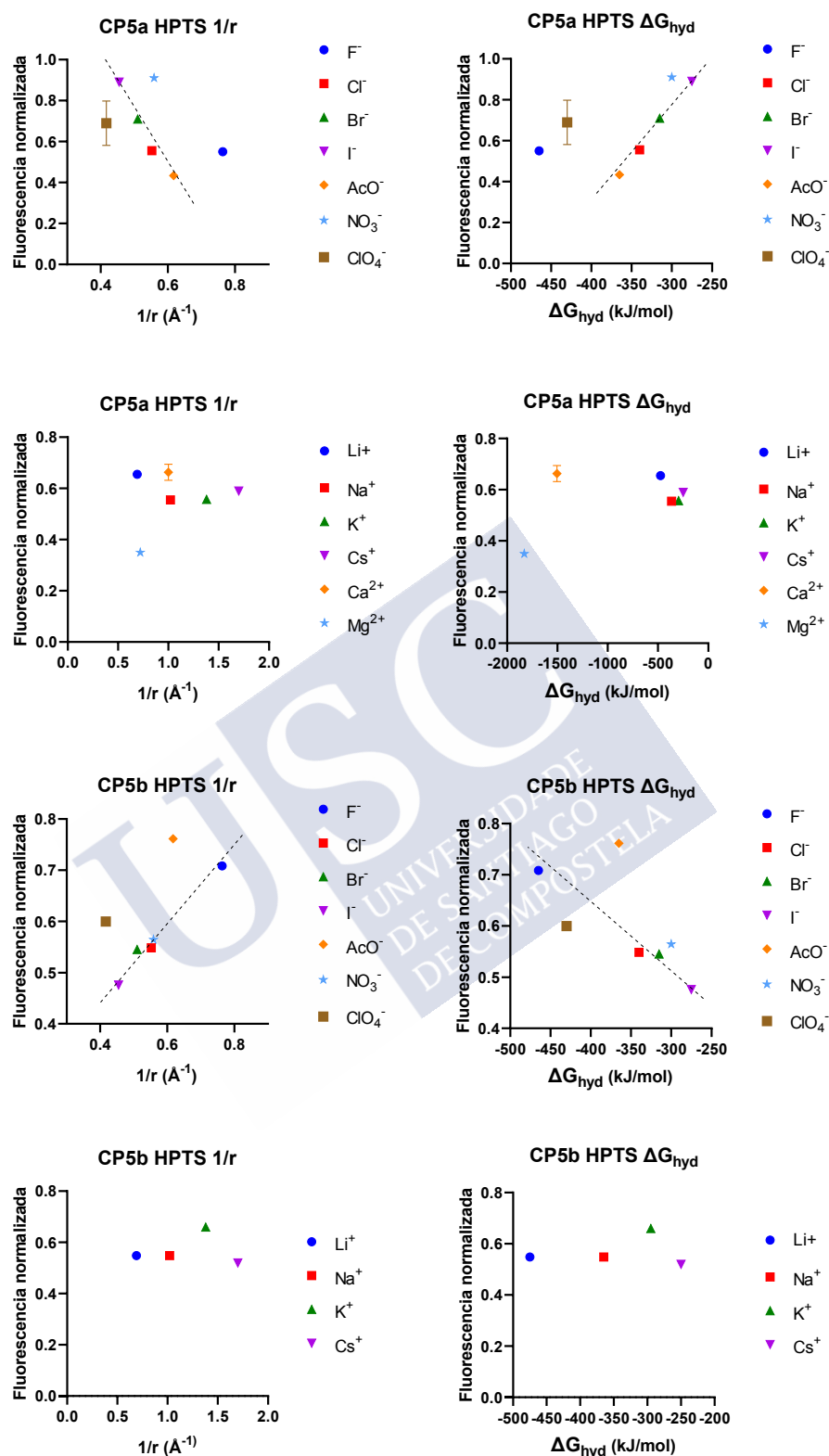


Figura 103. Porcentaje de transporte de **CP5a** (mitad superior) y **CP5b** (mitad inferior) frente a $1/r^{437}$ (izquierda) y ΔG_{hyd} (derecha) para cada ion extravesicular estudiado. Ambos transportadores fueron añadidos para alcanzar una concentración en cubeta de 1 μ M.

Por otra parte, **CP5b** exhibe la tendencia opuesta, estando favorecido el transporte de aniones pequeños con elevada energía de hidratación, mientras que, en el caso de los cationes, no parece haber diferencias notables entre los metales alcalinos. A pesar de que ninguno de los mecanismos de basificación directa de los presentados en la Figura 101 implica el transporte directo de los aniones bajo estudio, es posible que la basificación del interior tenga lugar mediante un mecanismo más complejo, en el que estos aniones sí desempeñen un papel relevante. Para profundizar más en la selectividad observada se podrían realizar experimentos adicionales en los cuales no solo se modifique la especie MX presente en el medio extravesicular, sino también en el intravesicular. De esta manera, se podría demostrar la presencia del proceso de liberación de HX desde el medio interno como causa de su basificación.⁴³⁸ No obstante, estos experimentos no se han llevado a cabo dada la necesidad de preparar un número muy elevado de vesículas diferentes.

Ante estas tendencias opuestas, y conociendo por el experimento previo que nos encontramos ante un proceso *symport*, podemos proponer dos mecanismos de complejación de las diferentes sales dependiendo de la posición relativa de los anillos de piridina (Figura 104). La preferencia de **D5a** por aniones grandes y la de **D5b** por aniones pequeños podría deberse a la orientación en la que estos se disponen en la parte externa o interna de la corona de piridinas, respectivamente, con las que interaccionan mediante contactos anion- π ⁴³⁹, dada la pobreza electrónica de este anillo. En ambos casos, en una de las tapas se produciría la estabilización del catión mediante el modelo de coordinación típico de las piridinas (a través del par electrónico sobre el átomo de nitrógeno).

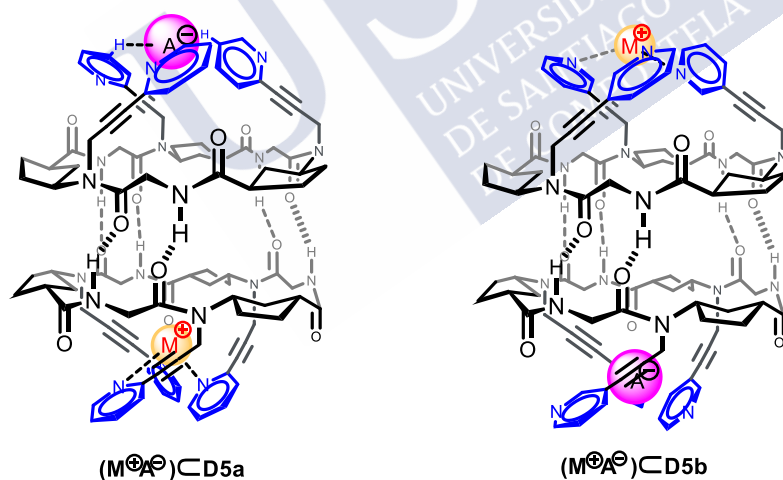


Figura 104. Propuesta de los diferentes modelos de coordinación de MX por parte de los ionóforos estudiados: **CP5a** (izquierda) y **CP5b** (derecha).

⁴³⁷ El valor del radio solo considera el ion y por tanto se refiere a la especie deshidratada.

⁴³⁸ Z. Li, L.-Q. Deng, Y. Chen, T. Wu, W.-H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 3665-3668.

⁴³⁹ P. de Hoog, P. Gamez, H. Mutikainen, U. Turpeinen, J. Reedijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5815-5817. P. Gamez, T. J. Mooibroek, S. J. Teat, J. Reedijk, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 435-444. L. Adriaenssens, G. Gil-Ramírez, A. Frontera, D. Quiñonero, A. C. Escudero-Adán, P. Ballester, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 3208-3218.

El último experimento llevado a cabo consistió en corroborar que, efectivamente, estos transportadores no forman ningún canal estable a través de la membrana, sino que operan mediante un mecanismo de ionóforo que se basa en su capacidad para migrar a través de las bicapas. Para este fin, pensamos en utilizar un lípido para formar las membranas cuya temperatura de transición de fase se encuentre en un rango apropiado, que permita determinar si el grado de movilidad de una membrana afecta a la actividad del transportador. Esta temperatura determina el umbral en el cual las bicapas pasan de estar en un estado que se denomina tipo “gel”, que se asemeja al estado sólido, con una fluidez muy limitada, a un estado denominado de “cristal líquido” (al superar dicha temperatura), que presenta mayor desorden y fluidez.⁴⁴⁰ La temperatura de transición de fase de una membrana viene determinada por la composición lipídica y, en medios biológicos, por la presencia de colesterol. Si se consideran únicamente membranas constituidas por fosfolípidos puros, como en nuestro caso, la temperatura de transición aumenta al disminuir el número de insaturaciones en las cadenas de los ácidos grasos y al aumentar la longitud (número de carbonos) de dichas cadenas.

En nuestro caso, hemos utilizado en todos los experimentos EYPC, la cual, a pesar de ser una mezcla de lípidos, se compone mayoritariamente de POPC, que presenta una temperatura de transición de fase de -2 °C, lo que hace imposible estudiar el transporte en régimen gel con este lípido al no poder trabajar en disolución acuosa por debajo de ese valor. Sin embargo, si se usa el lípido DPPC, el cual sustituye la cadena insaturada de ácido oleico por otra saturada de palmítico, esta temperatura sube considerablemente hasta los 41°C, haciendo que las vesículas formadas a partir de este lípido sean buenas candidatas para confirmar que la fluidez de la membrana es un requisito para la actividad de los ionóforos de este estudio. Tras llevar a cabo la preparación de las vesículas de DPPC cargadas con HPTS (ver Parte Experimental), con el transportador **CP5b** preincorporado (5 mol%), se llevó a cabo la basificación del medio extravesicular (adición NaOH) por encima (45°C) y por debajo (25°C) de la temperatura de transición de fase del DPPC.⁴⁴¹ Como se puede observar (Figura 105), la basificación del interior (aumento de fluorescencia) solo se observa por encima de los 41°C, cuando las membranas se encuentran en el estado de cristal líquido y su fluidez es mayor. Por debajo de esta temperatura, la membrana se comporta más como un sólido, a través de la cual los transportadores tipo *carrier* no pueden desplazarse con facilidad y, por ello, no pueden propiciar la basificación del medio.

Para finalizar este capítulo, decidimos realizar una serie de experimentos control para poder establecer las relaciones estructura-actividad de estos ionóforos, así como determinar el papel que juegan los tres residuos de piridina en el transporte. Por ello, decidimos evaluar primeramente una estructura análoga a los transportadores descritos en esta sección, pero sin los anillos de piridina. Para ello **CP5** resultó ser un candidato idóneo, ya que la única diferencia estructural con ellos es precisamente, la ausencia de estas tapas piridínicas.

⁴⁴⁰ T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, Wiley-VCH, Hamburg (2007).

⁴⁴¹ H. Behera, N. Madhavan, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12919-12922.

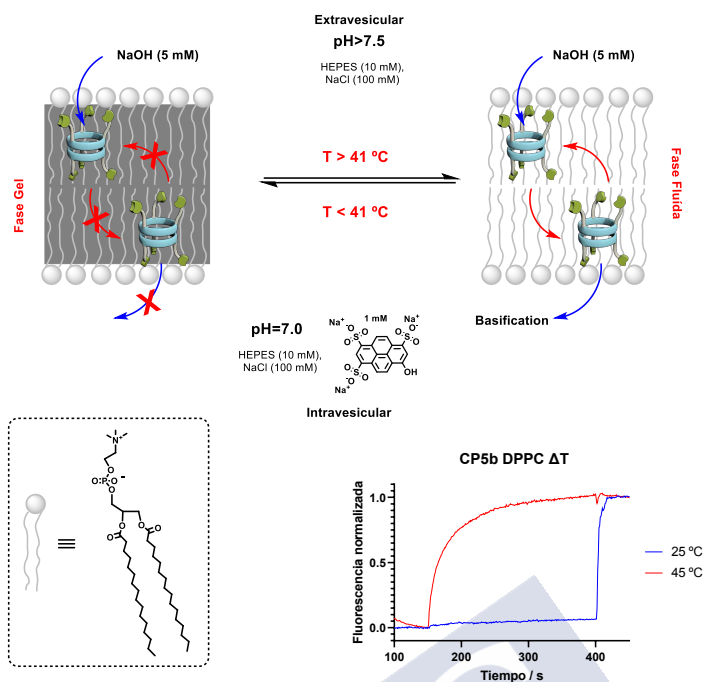


Figura 105. Experimento de HPTS \rightarrow LUVs compuestas por DPPC.

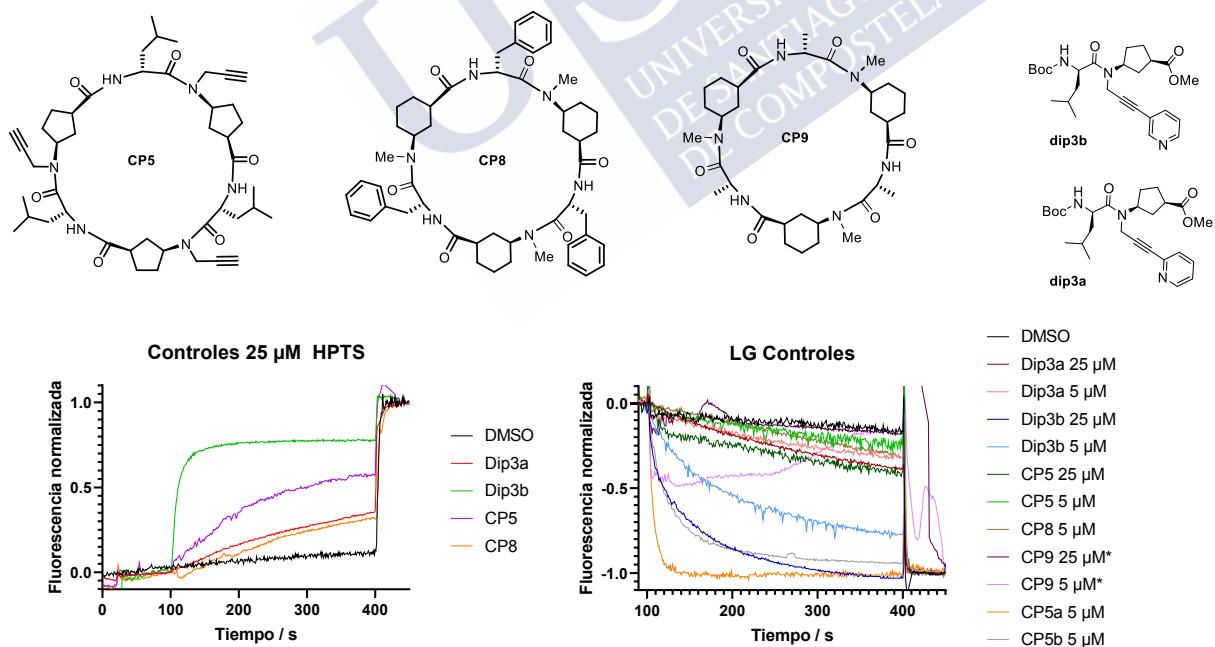


Figura 106. Experimentos de vesículas cargadas con HPTS (basificación) y con LG (transporte de Cl^-) con las diferentes moléculas control (parte superior) a las concentraciones indicadas. El * indica precipitación en cubeta, de ahí el comportamiento errático de las trazas de **CP9**.

A continuación, investigamos el papel que juega la plataforma ciclopeptídica en el proceso de transporte o, en otras palabras, si la disposición precisa de los grupos coordinantes es un requisito para el transporte de iones. Por ello, decidimos utilizar como control los dipéptidos protegidos **dip3a** y **dip3b**, los cuales pueden considerarse como unidades básicas constituyentes de **CP5a** y **CP5b**, respectivamente. Además, evaluamos la actividad de ciclo péptidos basados en el γ -Aa Ach, como **CP8**²³⁵ o **CP9** (cuya síntesis se describe en el Capítulo III), para estudiar el efecto de la ausencia de piridinas nuevamente y también la composición aminoacídica. Para evaluar las diferencias, repetimos los experimentos en HPTS \supset LUVs, LG \supset LUVs (Figura 106) y AQ-CF \supset LUVs (Parte Experimental, Figure 10).

Se pudo comprobar que el **dip3b** mostraba una actividad mucho más destacable en ambos experimentos que el resto de las especies analizadas, especialmente al compararse con su isómero que posee el anillo de piridina unido por la posición *orto*. En vista de este resultado, decidimos realizar un estudio más profundo con **dip3b**, con el fin de poder comparar sus parámetros de Hill con su ciclo péptido de referencia **CP5b** (Figura 107). Como se puede observar, el valor de la EC_{50} en los experimentos de LG \supset LUVs es un orden de magnitud más alto (1.53 μ M vs. 159 nM), lo que implica una menor actividad, en el caso del dipéptido que en del CP con piridinas en *meta*. Esto demuestra que, si considerásemos la contribución individual de cada anillo de piridina en el ciclo péptido por separado, su actividad solo debería ser tres veces (si consideramos el monómero) o seis veces (si consideramos la especie dimérica) mayor que su dipéptido constitutivo. El hecho de que la actividad del CP sea prácticamente diez veces superior, implica que existe un componente de cooperatividad entre las diferentes unidades coordinantes, propiciado muy probablemente por la disposición espacial que otorga la rigidez del esqueleto peptídico, la cual genera un entorno preorganizado para la complejación de los analitos.

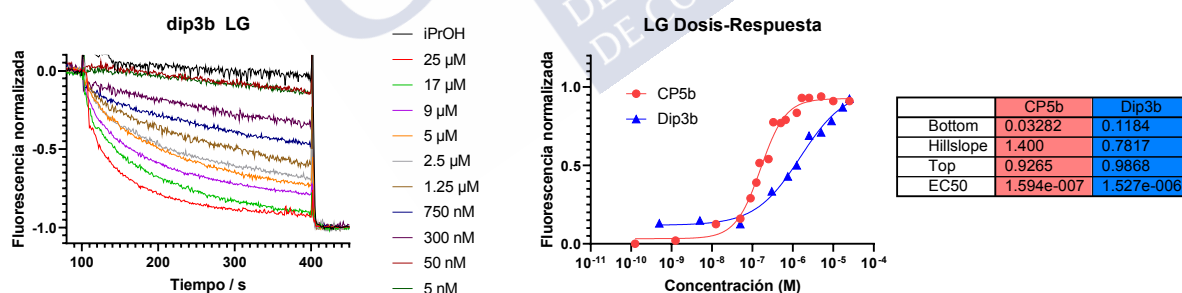


Figura 107. Trazas a diferentes concentraciones de **dip3b** en el experimento de LG \supset LUVs y comparativa en las curvas de Hill de **CP5b** y **dip3b**, donde se aprecia la mayor eficiencia del CP.

Además, para poner a prueba la hipótesis de que ambos extremos de la cápsula actúan simultáneamente a la hora de complejar un catión en un extremo y un anión en el opuesto, decidimos realizar un último experimento utilizando para el transporte una mezcla equimolar de los CPs complementarios **CP5a** y **CP8**, los cuales están compuestos por los γ -Aa Acp y Ach, respectivamente. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, en medios apolares estas dos especies forman preferentemente la especie heterodimérica **D5a-8** frente a sus respectivos homodímeros (**D5a** y **D8**).^{241b} **CP8** mostraba una reducida capacidad para el transporte de

protones y una actividad despreciable en para el transporte de iones, como puede apreciarse en la Figura 106. Al estudiar la mezcla de ambos ciclopeptidos con las vesículas de lucigenina, la pérdida total de actividad observada al comparar este experimento con **CP5a** puro (Figura 108, trazas azules), corrobora que es necesario que ambos extremos tripiridínicos colaboren el proceso de transporte. Si no fuese así, se esperaría una pérdida de actividad parcial (idealmente al 50%) derivada de la disponibilidad de únicamente una tapa en la especie activa.

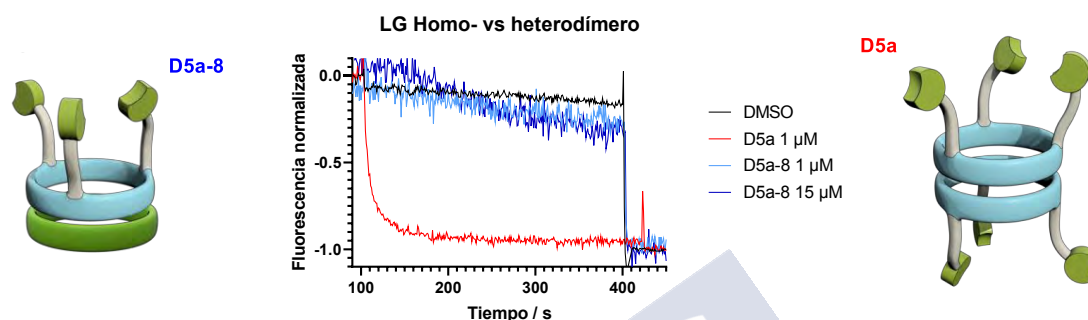


Figura 108. Comparativa entre homo- (**D5a**) y heterodímero (**D5a-8**) en el experimento de LG ⊃ LUVs. Se emplearon cantidades variables de CPs y en todos los casos las disoluciones intra- y extravesiculares contenían NaNO₃ (200 mM).

Como broche a este capítulo, a la vista de todos los anteriores resultados podemos concluir que la aproximación a la utilización de dímeros ciclopeptídicos basada en un modelo de ionóforo/*carrier*, ha demostrado ser mucho más efectiva que la basada en dímeros equipados con cadenas largas de etilenglicol para abarcar toda la membrana. Estos últimos presentaron actividades muy modestas en los ensayos estándar de disipación de gradientes de pH a través de membranas modelo, independiente de su diámetro y grado de sustitución. Este hecho propició que mostrasen problemas de solubilidad al tener que trabajar a concentraciones muy elevadas para poder observar una mínima actividad transportadora. Por otro lado, las moléculas basadas en un ciclohexapéptido que incorpora tres anillos de *orto*- o *meta*- piridinas, han demostrado su capacidad para rectificar el pH entre el interior y el exterior de membranas lipídicas modelo, así como de transportar NaCl y otras sales en rangos de concentraciones muy bajo (10^{-7} - 10^{-8} M). Por ejemplo, si comparásemos directamente el rendimiento de los hexapéptidos con tres sustituyentes en su vertical, los híbridos de PEG-amonio (**CP5S** y **CP5L**) presentaron una actividad (ver Tabla 1) como mínimo 350 veces peor (en términos de EC₅₀) que los péptidos que incorporan anillos de piridina en la vertical del macrociclo (**CP5a** y **CP5b**).

Además, la posición del átomo de nitrógeno resultó ser crucial a la hora de llevar a cabo el transporte selectivo de diferentes aniones, en los cuales se produce una inversión de la eficiencia transportadora si atendemos a factores como el radio iónico de los iones que se transportan. Además, la presencia de ambos extremos tripiridínicos demostró ser fundamental para mantener la actividad transportadora, a la vista de los resultados con sistemas heterodiméricos Acp-Ach. Se pudo comprobar que el régimen de fluidez de las membranas lipídicas a través de las cuales se produce la migración de iones es de vital importancia, lo que permitió descartar la formación de poros transmembranales estables y proponer el modo de

acción de ionóforo, en donde solamente una membrana plenamente fluida permite la acción de estos transportadores.





Capítulo III

Encapsulación de ligandos ditópicos mediante dímeros α,γ -ciclopeptídicos





Capítulo III: Encapsulación de ligandos ditópicos mediante dímeros α,γ -ciclopeptídicos

1. Encapsulación de ligandos homoditópicos con ciclohexapéptidos

Tras observar las prometedoras propiedades transportadoras como ionóforos *symporter* de los compuestos **CP5a** y **CP5b**, pensamos que estas moléculas precursoras de dímeros también podrían ser buenos candidatos para el reconocimiento supramolecular de ligandos orgánicos con grupos funcionales complementarios con los motivos de piridina que actúan como tapa del dímero ciclopeptídico. A pesar de que los ciclohexapéptidos no presentan una cavidad demasiado amplia (diámetro interno de 7 Å),⁴⁴² el impedimento estérico no debería ser un problema a la hora de internalizar pequeñas moléculas lineales que no presenten estructuras aromáticas en su esqueleto (de naturaleza alcano/alqueno lineal (*trans*), por ejemplo). Dada la flexibilidad que otorga la posición propargílica del espaciador que une los anillos de piridina al esqueleto peptídico, lo más probable es que, en ausencia de moléculas que interactúen con este anillo aromático, las piridinas se encuentren preferentemente en la conformación extendida (Figura 109, izquierda) en disolución. Recientes trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Prof. Pierangelo Metrangolo, permitieron obtener cristales de un derivado de **CP5b**, en los que dichas unidades aparecen orientadas hacia el exterior del monómero (Figura 109, abajo).⁴⁴³ De esta forma, existe el mayor espacio posible entre un anillo y otro, minimizando de esta manera las repulsiones estéricas. No obstante, al añadir un ligando apropiado, es de esperar que se produzca una reorientación de los residuos aromáticos hacia una conformación cerrada (Figura 109, derecha), donde las tres piridinas establezcan una interacción múltiple y cooperativa que estabilice el sistema. A pesar de esto, también cabría la posibilidad de que dicha cooperatividad surja de un proceso intermolecular, en el cual anillos de piridina unidos a CPs diferentes establezcan interacciones con un ligando por la parte externa la molécula en vez de a través de su cavidad.

Por ese motivo, proponemos la encapsulación de ligandos que presenten dos grupos funcionales en cada extremo de una cadena alifática, ya que, de esta forma, se puede producir un “efecto quelato” mediante el cual se favorezca la formación del complejo de inclusión sobre la opción intermolecular, donde varios dímeros entrarían en juego. Para que este efecto quelato se produzca, es de vital importancia que la longitud entre ambos grupos funcionales de la molécula huésped sea la apropiada, de manera que la contribución entálpica derivada de la interacción simultánea con ambas tapas sea suficiente para pagar el peaje entrópico de la formación del complejo de encapsulación, así como de compensar el coste estérico del cierre de las tapas de piridina.

⁴⁴² R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, 3267-3269.

⁴⁴³ H. L. Ozores, M. Calvelo, R. García-Fandiño, M. Amorín, A. Pizzi, N. Demitri, G. Terraneo, P. Metrangolo, J. R. Granja, manuscrito en preparación.

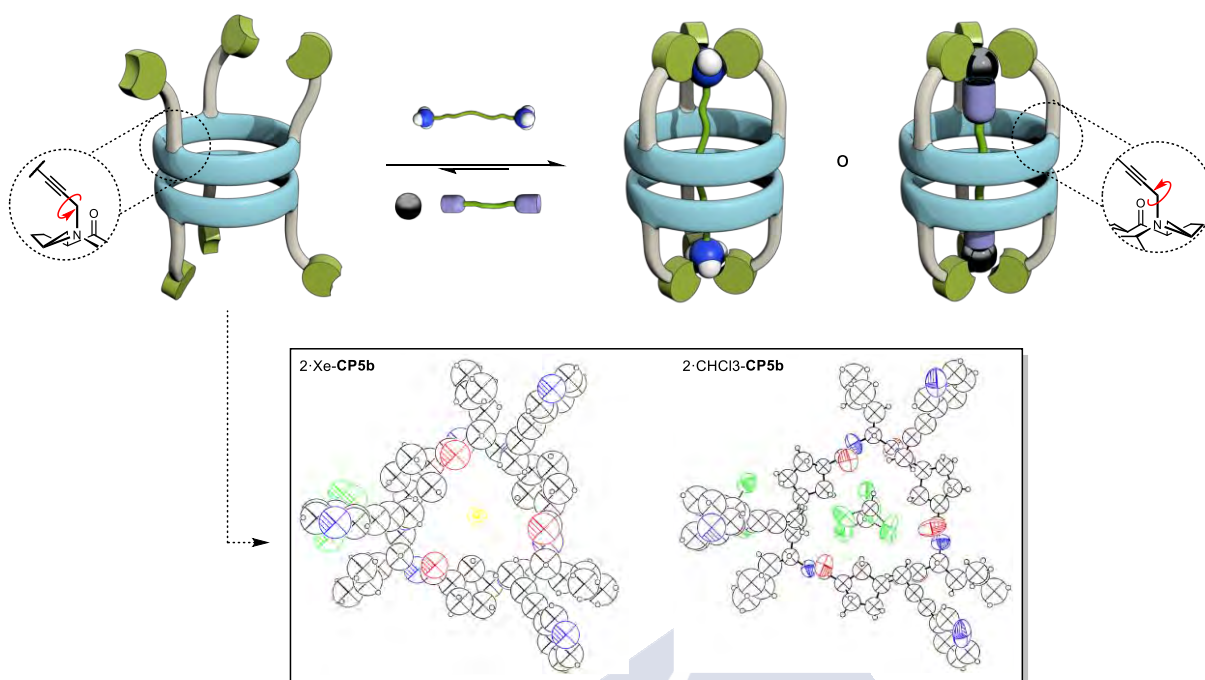


Figura 109. Esquema del proceso de encapsulación de ligandos ditópicos mediante ciclohexapéptidos *N*-funcionalizados con tapas de piridina. En la parte inferior se muestra la estructura cristalina de dos complejos derivados de **CP5b** en los que se aprecia la orientación de los anillos de piridina hacia el exterior.

Dadas las propiedades químicas del anillo de piridina, con un par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno que le confiere un carácter básico, estos motivos estructurales pueden utilizarse como aceptores de enlace de hidrógeno, así como ligandos en química de coordinación, donde son capaces de complejar una amplísima variedad de centros metálicos de diferente carga y geometría.⁴⁴⁴

1.1. Encapsulación de dinitrilos tras la complejación de iones metálicos

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, estos sistemas diméricos basados en ciclohexapéptidos también permiten utilizar una estrategia alternativa a la internalización de los ligandos mediante la formación de enlace de hidrógeno directa con las piridinas. La primera estrategia de encapsulación que se explorará en este capítulo consiste en, en primer lugar, aprovechar la capacidad coordinante de los anillos de piridina para la complejación de un metal, para que luego sea este el que dirija la introducción de un ligando apropiado en la cavidad que define el dímero ciclopeptídico. Esta estrategia requiere la elección apropiada de un centro metálico que tenga unas características concretas, ya que, idealmente, debería presentar un número de coordinación de cuatro en donde tres de las posiciones de coordinación las ocuparían las piridinas de la tapa de la cápsula y donde el último orbital vacante se emplearía en dirigir a

⁴⁴⁴ G. de Ruiter, M. Lahav, M. E. van der Boom, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3407-3416.

un cuarto ligando (que actúa además como *guest*) hacia el interior de la cavidad. Por ello, pensamos que la geometría resultante queda limitada, *a priori*, a la tetraédrica.

En estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación se estudió el comportamiento de un sistema dimérico similar a **CP5a**, aunque más flexible, al que se denominará como **CP5c** (Figura 110), en el que los triples enlaces conjugados con el sistema piridínico se habían reducido. Este compuesto se puso en presencia de diferentes sales metálicas y, posteriormente se añadieron ligandos del tipo alquil-dinitrilo, tal y como se muestra a continuación.⁴⁴⁵

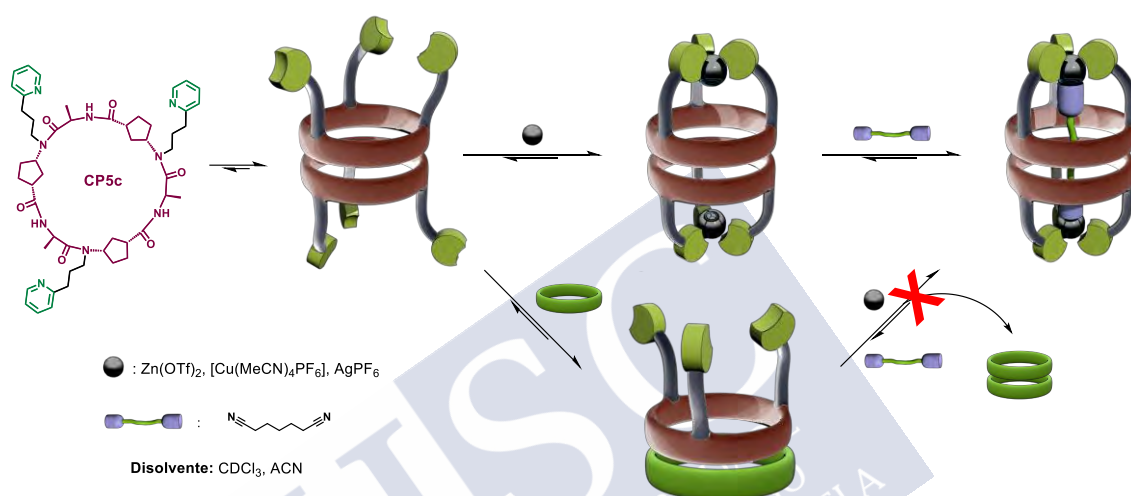


Figura 110. Representación esquemática de todos los estudios llevados a cabo con **CP5c** en el grupo de investigación con anterioridad a la obtención de los resultados que abarca este capítulo.

Inicialmente se realizaron los experimentos de coordinación con sales de Ag(I) y Cu(I) (concretamente, AgPF₆ y [Cu(MeCN)₄PF₆]) en CDCl₃ y acetonitrilo (ACN). En ellos se mostraba que, al añadir 2 equiv del metal sobre una disolución de **D5c** (un equivalente por tapa de tripiridina), se producía el ancheamiento y pérdida de definición e intensidad de las señales más características del espectro de ¹H RMN. Esto iba acompañado del enturbiamiento de la disolución, posiblemente como consecuencia de la precipitación de alguna de las especies. En el caso de Zn(II), la solubilidad era notablemente mejor y se observaban sustanciales variaciones en el espectro del CP, en el cual aparecía una única nueva especie que se diferenciaba con respecto a la sustancia de partida en las señales de los anillos de piridina. Desafortunadamente, este nuevo dímero metalado, al ser tratado con un dinitrilo (1,5-dicianopentano), no mostró indicios de ser capaz de encapsularlo, al no apreciarse variaciones en sus señales tras la adición de este.

Seguidamente, se intentó revertir la formación de un sistema heterodimérico, apoyándose en el efecto quelato que se produciría en el proceso de encapsulación de un ligando bidentado

⁴⁴⁵ H. Lionel Ozores. *Diseño y síntesis de cápsulas moleculares y sistemas mesógenos basados en ciclopeptidos* (Tesis doctoral), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2018).

por parte de la cápsula. En este caso, tras formar el heterodímero **D5c-8**, derivado de la mezcla equimolar de **CP5c** y el péptido $c\text{-}[(D\text{-Phe-}^{Me}N\text{-}L\text{-Ach})_3]$ ²³⁵ (**CP8**, Figura 111), se repitió el estudio de complejación metálica con las mismas sales descritas en el párrafo anterior. La solubilidad de las especies resultantes mejoró sustancialmente con respecto a los experimentos realizados con el homodímero. Las adiciones de Cu(I) dieron lugar a mezclas en la que se apreciaba una mayor presencia de **D8** tras añadir la sal metálica. El incremento en la proporción de este homodímero se utilizó como prueba indirecta de que **CP5c** estaba precipitando al coordinarse el metal. En cualquier caso, la adición de un dinitrilo sobre las especies de coordinación no dio lugar al comportamiento esperado. En ningún caso se observó ninguna variación que hiciese sospechar que la coordinación del metal desplace el equilibrio hacia la formación de los complejos homodiméricos.

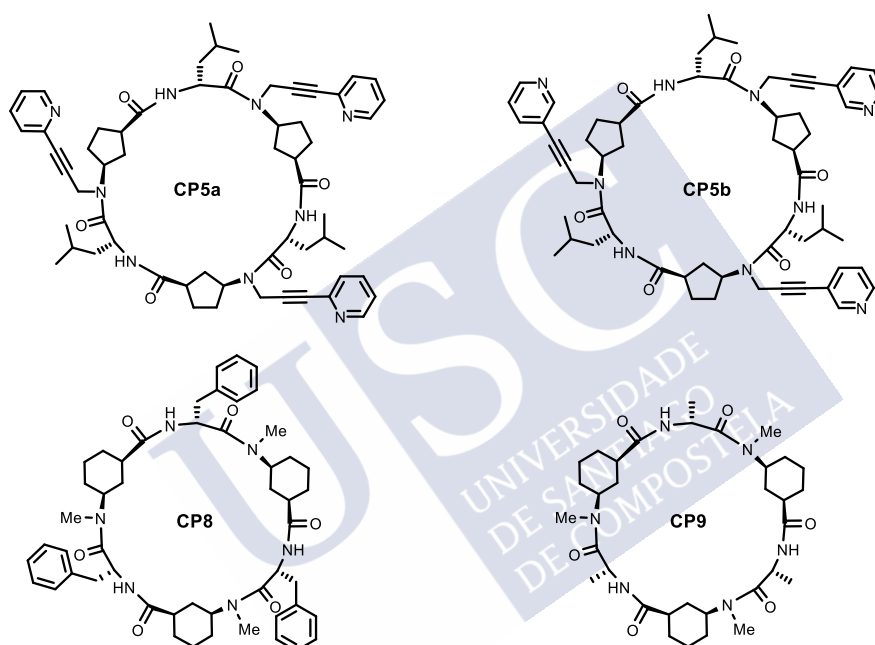


Figura 111. Estructura de los diferentes CPs basados en Acp (**CP5a/b**) y Ach (**CP8/9**) empleados en el estudio con ligandos de alquildiamonio.

En base a estos resultados previos, nos decidimos a utilizar esta estrategia de encapsulación metálica con el sistema dimérico **D5a**, en colaboración con el Dr. H. Lionel Ozores. Pensábamos, que los numerosos problemas de solubilidad encontrados con anterioridad para el **CP5c** podrían ser debidos a que el sistema contaba con un espaciador demasiado flexible que introduce en el sistema demasiados grados de libertad y no “fuerza” a los ligandos piridina a permanecer en la conformación apropiada para la correcta coordinación/encapsulación. En esta nueva aproximación, se decidió utilizar nuevamente el espaciador propargílico para intentar paliar precisamente este comportamiento. Además, el nuevo sistema utiliza como α -Aa leucina en lugar de alanina, lo cual, sobre el papel, debería favorecer la solubilidad de las especies metaladas al reducir la polaridad del péptido. En esta línea, en primer lugar, optamos por el estudio de complejación de $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6]$ por parte de **CP5a**.

Conociendo los problemas de solubilidad previos, para dotar al sistema de una lipofilia adicional, decidimos incluir en la mezcla de reacción el anión hidrofóbico voluminoso *tetrakis*[3,5-*bis*(trifluorometil)fenil]borato ($^-\text{BAR}_\text{F}$), con la idea de que, tras producirse la metalación, el sistema catiónico de Cu(I) (idealmente con un ligando MeCN proyectado hacia el interior de la cavidad) disponga de un contraión lo suficientemente lipófilo que ayude a que permanezca en la disolución orgánica. De esta forma, al añadir $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6]$ (2 equiv) sobre una disolución de **D5a** y $^-\text{BAR}_\text{F}$ (2 equiv) en THF deuterado, inmediatamente se observa la aparición de un nuevo juego de señales (resultado análogo al obtenido en la traza **D5a** + CuI 5' de la Figura 113) junto con las de las del dímero de partida, en una proporción de 2:1 a favor de la nueva especie. Esta observación parece indicar la formación de una especie doblemente metalada con Cu(I) que está en equilibrio lento en la escala de tiempo del RMN con la sustancia de partida. Desafortunadamente, esta disolución, la cual es originalmente transparente, acaba tornando en cuestión de minutos a tonos desde ligeramente verdosos a azul intenso, y se produce la aparición de precipitado en el tubo de RMN con la consiguiente pérdida de definición de las señales en el espectro de protón. Estos resultados son consistentes con un proceso de oxidación del centro metálico de Cu^+ a Cu^{2+} , seguramente promovido por el oxígeno del aire. Este experimento se intentó realizar bajo una atmósfera inerte (Ar), aunque no fue posible alargar la vida de la especie deseada más allá de los 10 minutos (teniendo en cuenta la coloración de la disolución). Por último, decidimos repetir el experimento en presencia de 1 equiv por dímero de los dinitrilos 1,4-dicianobutano, 1,5-dicianopentano y 1,6-dicianohexano, con la idea de ver si el efecto quelato confería una estabilidad adicional al sistema. Desafortunadamente, esta estrategia dio lugar a una oxidación más rápida si cabe, que impedía la observación de señales definidas (el núcleo de Cu(II) es paramagnético)⁴⁴⁶ en el espectro de ^1H RMN ni inmediatamente después de la adición del complejo de cobre sobre la mezcla del resto de componentes. La presencia de cantidades elevadas (>50 equiv) de un reductor como el ascorbato sódico tampoco demostró limitar el alcance de este proceso.

Las complicaciones que dan lugar a la oxidación del centro metálico nos llevaron a estudiar otras fuentes de Cu(I) en un intento de minimizar este proceso no deseado. Para la identificación de un nuevo candidato, recurrimos a la teoría HSAB, también conocida como teoría ácido-base de Pearson.⁴⁴⁷ Este planteamiento, que fue propuesto en la década de los 60 por el químico R. G. Pearson, describe de manera cualitativa los factores que determinan la estabilidad de la interacción entre ligandos y centros metálicos en base a sus propiedades de dureza (“duros o blandos”).⁴⁴⁸ Así, se describe la preferencia en la formación de especies de coordinación entre ácidos y bases de naturaleza semejante (ácido duro con base dura o ácido blando con base blanda). Siguiendo esta teoría, el Cu(I) es un ácido blando ya que no presenta un elevado estado de oxidación y, por ello, formará complejos más estables con ligandos blandos, los cuales se caracterizan por presentar un tamaño grande y una elevada polarizabilidad. Por ello, decidimos centrar nuestra atención en el complejo CuI, en el cual la naturaleza del enlace Cu-I puede ser considerada prácticamente como covalente, al encontrarse el ion yoduro en el extremo de la lista de los ligandos blandos debido a su gran tamaño. De esta manera, el metal permanece en estado de oxidación +1 dada la inestabilidad del complejo CuI_2 , ya que la naturaleza del Cu(II) es de ácido de frontera o intermedio. No obstante, la elección del CuI como fuente de metal presenta una dificultad adicional, y es que precisamente el

⁴⁴⁶ A. J. Pell, G. Pintacuda, C. P. Grey, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2018**, DOI: 10.1016/j.pnmrs.2018.05.

⁴⁴⁷ R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **1968**, 45, 581-586. R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **1968**, 45, 643-648.

⁴⁴⁸ R. G. Pearson, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 403-425.

marcado carácter covalente de la unión entre metal y ligando aniónico le confiere una gran estabilidad que puede presentar alguna dificultad a la hora de llevar a cabo la encapsulación de sustancias dítópicas en el interior de la cápsula lo que, recordemos, es el objetivo principal de este proyecto.

Para solventar este nuevo escollo planteamos la estrategia que se describe en la Figura 112. De esta forma, una disolución de **D5a** se trataría en primer lugar con CuI de tal manera que este se coordine para dar lugar a una especie dimérica cerrada, en la cual previsiblemente el yoduro estaría albergado en la cavidad del esqueleto peptídico. Es difícil predecir si la morfología será lineal (como se indica en el dibujo) o si los ligandos yoduro estarán actuando como puente interaccionando simultáneamente con los dos centros metálicos, ya que varios estudios sobre la morfología de los halogenuros de Cu(I) evidencian la variabilidad en la estructura cristalina de estos.⁴⁴⁹ Independientemente de la disposición geométrica que dichos ligandos adopten en la cavidad, esta no parece que vaya a ser muy relevante, ya que la última etapa de esta aproximación consistiría en provocar la sustracción de los iones yoduro mediante el tratamiento de este complejo con una sal de Ag(I). La precipitación del AgI, daría lugar a una nueva especie catiónica en la que el anión no está en la esfera de coordinación del metal, lo que dejaría un orbital vacante en cada metal para acomodar un *guest* bifuncional.

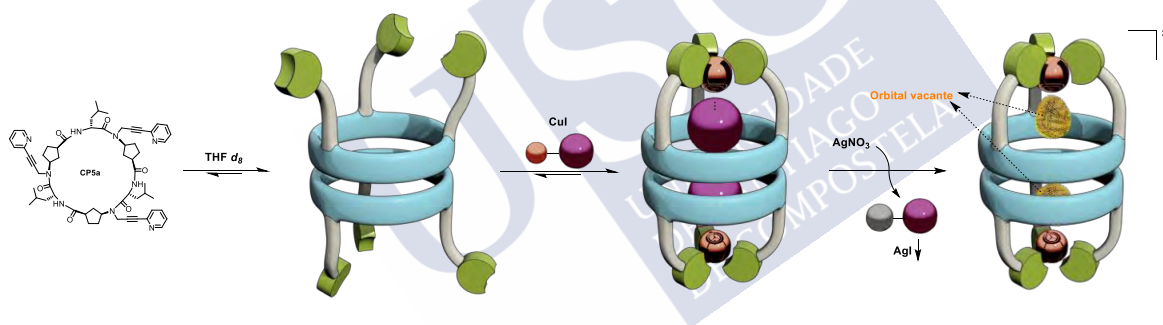


Figura 112. Estrategia seguida para la generación de la cápsula **D5a** coordinada con Cu(I) en la cual la precipitación de dos ligandos yoduros facilitan la disposición de una posición de coordinación vacante que apunta hacia la cavidad.

Concretamente, a nivel experimental, el proceso se llevó a cabo sobre una disolución de **CP5a** en THF d_8 (5 mM), sobre la cual se añadieron dos equivalentes de CuI y NaBAR_F y un equivalente de un dinitrilo lineal. Tras una leve agitación manual se tomó un espectro de protón de esta muestra, el cual era similar al obtenido en el experimento previo realizado con [Cu(MeCN)₄PF₆]. En él se apreciaba la formación de una nueva especie en el espectro (señales indicadas por un círculo rojo en la Figura 113), caracterizada por los desplazamientos químicos de alguna de las señales de los apéndices alquilpiridínicos. Las señales más afectadas son las asignadas a los protones propargílicos diastereotópicos ($\Delta\delta=0.52$ y 1.15 ppm) y los del anillo de piridina, donde H₆ destaca por encima del resto con una variación en su desplazamiento químico superior a 1 ppm ($\Delta\delta=1.26$ ppm). Bajo estas condiciones aún se observaban las señales

⁴⁴⁹ F. Wei, X. Liu, Z. Liu, Z. Bian, Y. Zhao, C. Huang, *CrystEngComm* **2014**, 16, 5338-5344. Y. Niu, N. Zhang, H. Hou, Y. Zhu, M. Tang, S. Ng, *J. Mol. Struct.* **2007**, 827, 195-200.

de la sustancia de partida en una relación de 1:1:1 a favor de la nueva especie. La simplicidad en el espectro de la nueva especie la atribuimos a que la cápsula se cierra coordinando dos moléculas de CuI. Se comprobó, que esta especie puede evolucionar con el tiempo si se le aplica una suave agitación mecánica hasta alcanzar una proporción de 3.2:1, que se corresponde con la traza C) de la Figura 113. Cabe destacar que la adición de cantidades mayores de la sal metálica (entre 2 y 3 equivalentes adicionales) permitió observar por RMN una conversión casi total ($>10:1$) hacia la especie metalada (ver Parte Experimental). Adicionalmente, la estabilidad de este complejo de cobre resultó ser mayor que la preparada por el método anterior, ya que el espectro de protón no varía tras mantener la disolución dentro del tubo de RMN durante un par de días bajo argón y protegida de la luz. Aparte de RMN, este intermedio también se detectó por espectrometría de masas, donde se observó la especie correspondiente al **D5a** + 2CuI + H⁺ con un valor de m/z de 2419.07 y la masa de la especie monomérica (**CP5a**) unido a una molécula CuI y un ion Na, con m/z de 1229.67 (ver Figure 19, Parte experimental).

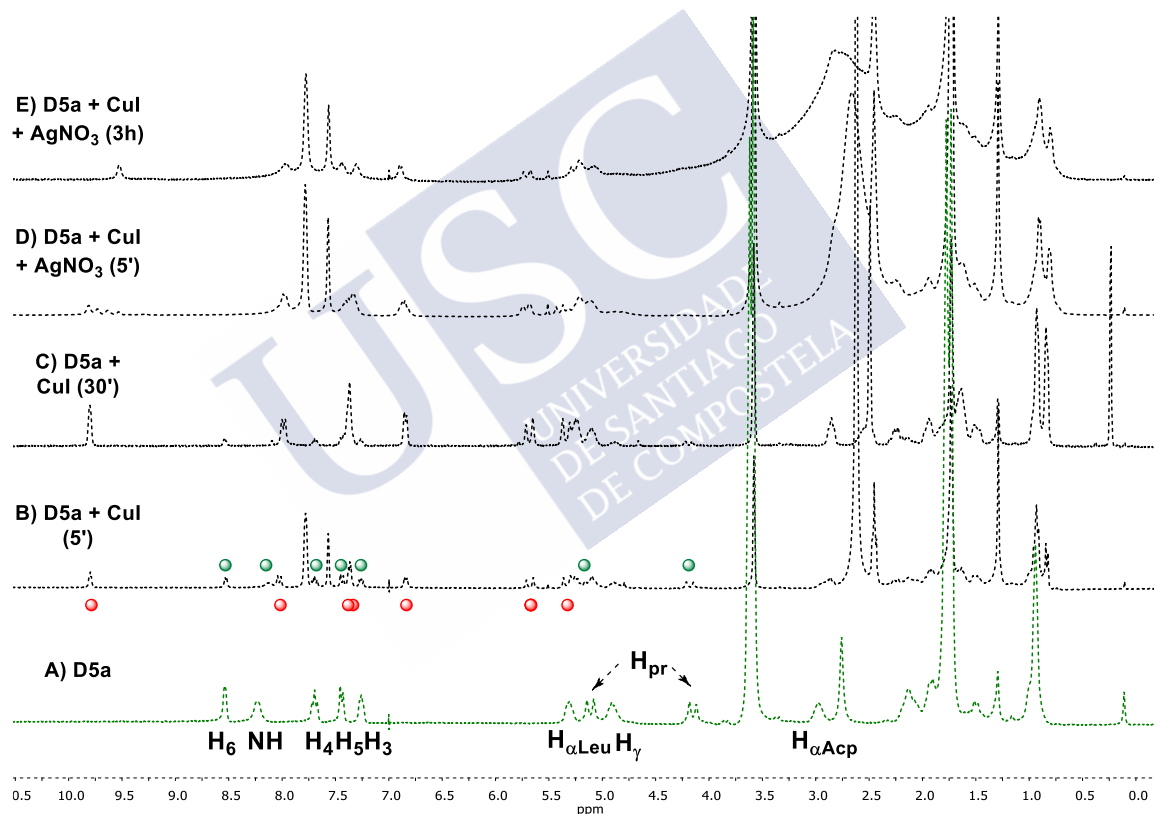


Figura 113. Espectros de ^1H RMN obtenidos de los experimentos de adición sucesiva de 2 equiv de CuI^{450} y AgNO_3 sobre una disolución 5mM de **D5a** y 1,4-dicianohexano en $\text{THF } d_8$.

A continuación, se procedió a añadir la sal de plata sobre la mezcla previa, lo que dio lugar a la aparición de una turbidez de color grisáceo en el seno de la disolución. El espectro tomado inmediatamente después de dicha adición muestra cambios muy reseñables en la

⁴⁵⁰ Los experimentos a diferentes tiempos tras la adición de CuI fueron tomados en experimentos independientes. La traza C) (30') no contiene BAr_F , para evidenciar la naturaleza covalente del enlace Cu-I.

muestra. En primer lugar, las señales residuales de **D5a** de partida (sin metalar) desaparecen totalmente. Sin embargo, la señal del protón H₆ que resonaba a 9.80 ppm ahora aparece desdoblada en otras tres especies minoritarias adicionales. Para otras señales este desdoblamiento es menos aparente, aunque parecen más anchas que las del espectro anterior a la adición de la sal de plata (Figura 113B y C). Curiosamente, al extender el tiempo de reacción, la mezcla evoluciona hasta que las cuatro especies presentes en la traza de *D*) de la Figura 113 dan paso a una única especie, que aparentemente era la minoritaria a tiempos cortos tras la adición de la sal de plata. La explicación a esta observación experimental puede venir de dos fenómenos diferentes, los cuales se detallan a continuación. Por un lado, es posible que el proceso de sustracción del ion yoduro por parte de la plata pueda ser cinéticamente lento, puesto que este se encuentra protegido por el esqueleto peptídico del dímero que forma la cavidad y, además, puede darse la precipitación parcial de un único halogenuro del interior, lo que daría lugar a especies intermedias. Por otra parte, también es posible que la plata tenga la capacidad de coordinarse con el **CP5a**, ya sea en su forma pura o tras un intercambio con el CuI de partida. Esto explicaría la desaparición de las señales residuales del dímero de partida, pero en vista de los resultados previos con **CP5c** descritos al principio de esta sección, parece improbable que la solubilidad permanezca inalterada durante tantas horas si este proceso se produjese. Además, al no añadirse un gran exceso de ion plata, es de esperar que, si la transmetalación tuviese lugar, necesariamente la plata y el yoduro tendrían que encontrarse en espacios muy próximos en algún momento de este proceso, donde sería extraño que no se produjese la precipitación AgI con anterioridad a la transmetalación.

Como se ha comentado previamente, el proceso de metalación en dos etapas se llevó a cabo en todos los casos en presencia de una molécula de bisnitrilo para intentar favorecer su atrapado una vez retirado el yoduro que acompaña inicialmente al ion Cu⁺. El primero de los nitrilos testados fue el 1,4-dicianohexano (comúnmente conocido como adiponitrilo). Su elección se basó en la analogía que este presenta con respecto a los tamaños probados en la primera parte de este capítulo, ya que, si se compara la longitud de este nitrilo complejoado a cobre con la longitud del residuo de hexanodiamonio interaccionando con la tapa de piridinas por enlace hidrógeno, estas parecen ser bastante similares. Como se puede observar en la Figura 113 tras la adición del cobre y la plata, se produce una pérdida progresiva de la definición en la zona del espectro con desplazamientos químicos menores a 3 ppm. Esta falta de resolución hizo inviable realizar experimentos de RMN adicionales (nOe o DOSY) para dilucidar si se forma el complejo de encapsulación (las señales de adiponitrilo en THF aparecen entre 2.45 y 1.73 ppm, donde la resolución es más pobre).

Con vistas a solucionar este problema, intentamos buscar un ligando que poseyese algún protón cuyas señales se diferencien de manera inequívoca a las señales de la capsula peptídica. Por ello, nos decantamos por el uso del *trans*-hex-3-enodinitrilo, cuyas señales vinílicas y alílicas resuenan a 5.81 y 3.22 ppm, respectivamente (Figura 114, arriba). El procedimiento se llevó a cabo de manera análoga al descrito previamente para la encapsulación del adiponitrilo. De nuevo, al añadir la sal de plata, se pudo observar la desaparición de las señales residuales del ciclopéptido no complejoado al cobre (por ejemplo, el multiplete a 8.52 ppm de H₆) tras tan solo unos pocos minutos. Sin embargo, en este caso no se observa la rápida aparición de las tres especies nuevas anteriormente observadas. Por el contrario, el dímero coordinado al yoduro de cobre sigue siendo la especie mayoritaria (Figura 114B), aunque se observan un grupo de nuevas señales (entre 9.75 y 9.55 ppm) que atribuimos a dos especies minoritarias (ratio 10:2:1), tal como se muestra en el recuadro de la Figura 22 en la que se amplía la zona entre 9.20 y 10.15 ppm). Con el paso de las horas, el espectro sigue evolucionando para dar lugar a la

aparición de nuevas señales y a la desaparición de las señales del primer intermedio. En cualquier caso, la complejidad de este espectro sugiere la formación de una mezcla más compleja. Esta evolución se siguió durante días sucesivos hasta que, pasados seis días (traza D), Figura 114), el proceso parece que ya no sigue evolucionando hacia nuevas especies. En este punto final parecen apreciarse únicamente dos especies diferentes en una relación aproximada de 3.5:1 (estimado a partir de la integración de las señales de H₃ en torno a 6.82 ppm).

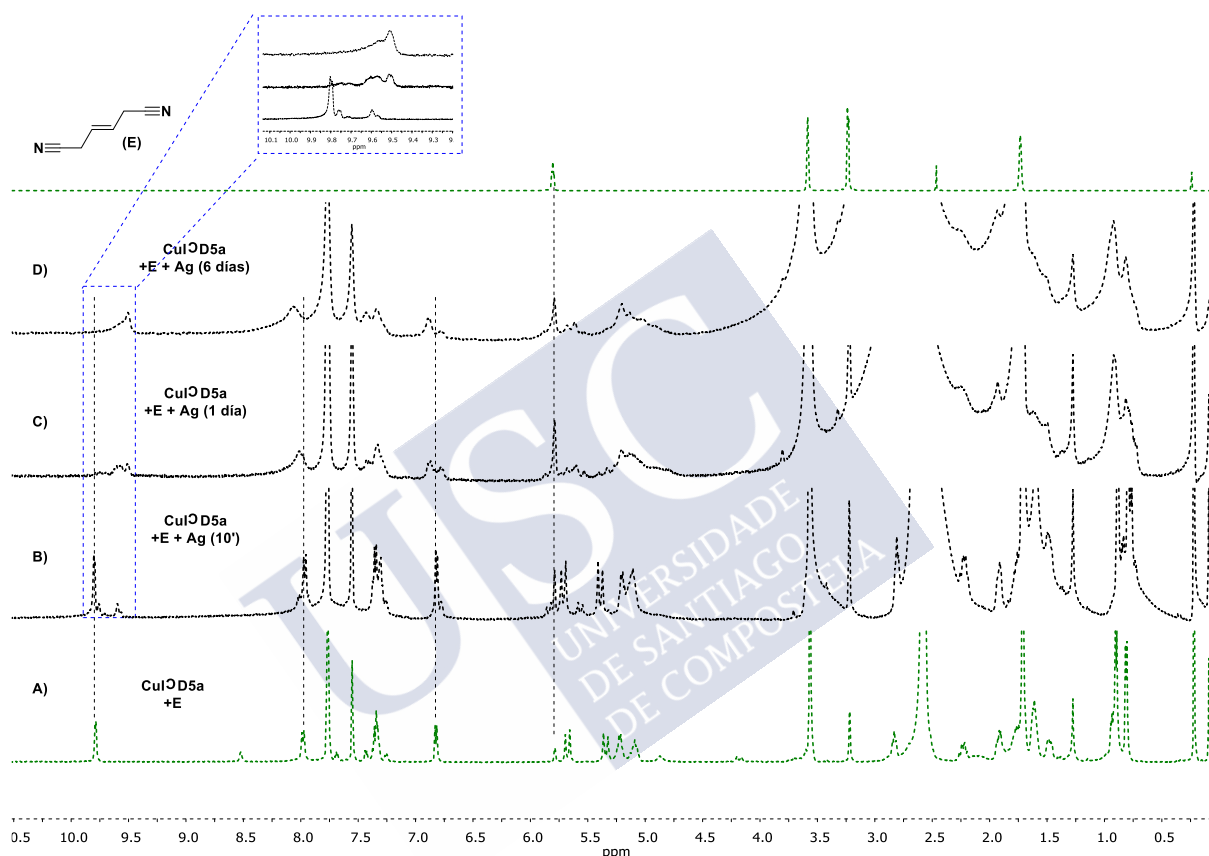


Figura 114. Proceso de encapsulación de *trans*-hex-3-enodinitrilo en el complejo **Cu₂D5a**.

Además de las variaciones en los espectros ya comentadas, cabe destacar que tras añadir 2 equiv de AgNO₃, el precipitado inicialmente blanquecino se va volviendo poco a poco amarillo verdoso y la turbidez va en notable aumento con el paso de las horas. El evidente anheamiento de las señales del péptido (compárese la traza a B) y C) de la Figura 114), por ejemplo), así como el incremento de la relación entre las señales del dinitrilo insaturado y el dímero, evidencian la posible precipitación parcial del ciclopeptido. A pesar de todas las variaciones ya comentadas con el paso del tiempo, la señal olefínica (5.79 ppm) del ligando no sufre ninguna variación a lo largo del experimento, lo que parecía confirmar que no se estaba formando el complejo de inclusión. Para aclarar esta duda, se llevaron a cabo experimentos de difusión de esta mezcla (Figura 115), los cuales, desafortunadamente parecen descartar la formación del complejo al aparecer dos bandas de migración diferentes para las señales

correspondientes al esqueleto peptídico y al *trans*-hex-3-enodinitrilo. Además, el valor de difusión de este último componente en la mezcla es idéntico al del ligando puro, lo que también descarta un equilibrio rápido entre la forma complejada y libre. En resumen, todos estos resultados ponen de manifiesto que el complejo de Cu formado es incapaz de inducir la encapsulación la molécula de *trans*-hex-3-enodinitrilo. A pesar de este resultado, nos planteamos que en este caso es posible que la rigidez del ligando empleado impida que este pueda adoptar una conformación en el interior de la capsula que permita coordinarse con ambos iones de cobre. Esto podría explicar las diferencias observadas entre ambos experimentos en los que se cambiaban únicamente el bisnitrilo.

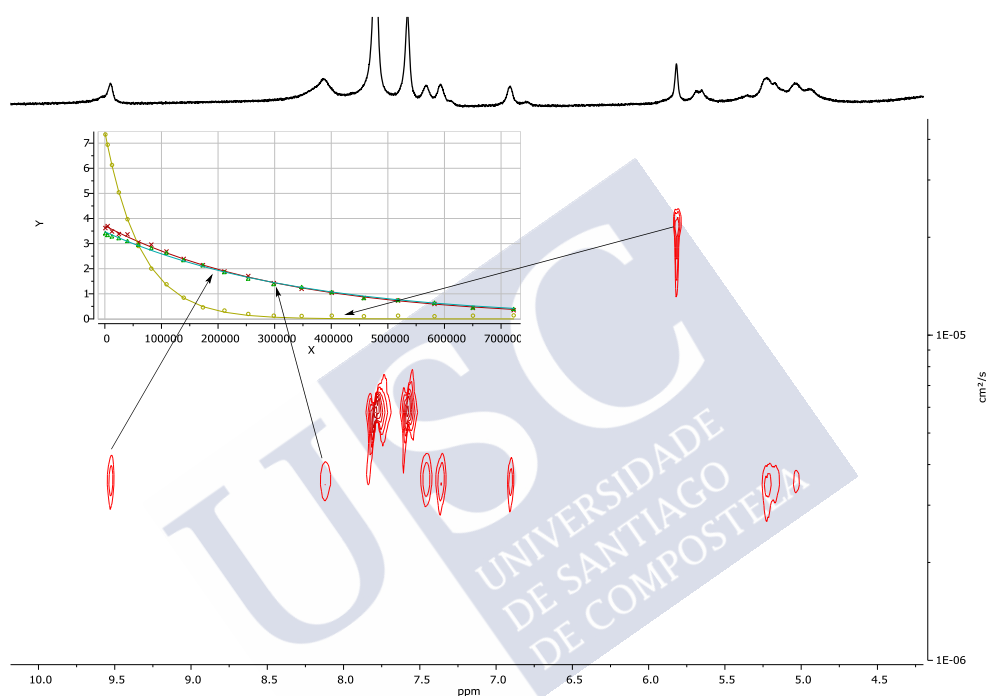


Figura 115. Espectro resultante del experimento DOSY realizado a la mezcla formada por el **CP5a** en presencia de un equivalente CuI, *trans*-hex-3-enodinitrilo, NaBAR_F y AgNO₃ en THF *d*₈ resultante de las adiciones ilustradas en la Figura 114. Se puede observar una difusión diferente entre las señales del péptido y las del hexenodinitrilo (señal a 5.79 ppm, difusión rápida).

Como última tentativa, estudiamos la encapsulación de un ligando dinitrilo más corto como el succinonitrilo (1,2-dicianoetano). Tras repetir el procedimiento seguido en los dos últimos experimentos, pero añadiendo una cantidad de CuI ligeramente mayor para desplazar la mezcla hacia la complejación prácticamente total de la sustancia de partida (relación mayor de 10:1, la caracterización de esta especie se muestra en el Anexo). En estas condiciones se pudo observar que a tiempos cortos (hasta 20 horas, Figura 116) tras la adición de la sal de plata no se produce ningún cambio en el espectro de la especie **(CuI)₂⊃D5a**. En este punto, decidimos forzar el proceso añadiendo otros 2 equivalentes de AgNO₃ (4 equiv en total), lo que provocó un cambio intenso en la coloración de la muestra hacia tonos verdes y una precipitación progresiva del dímero, hasta el punto de que 3 horas después de la segunda adición de sal de plata dimos por finalizado el experimento al ser el ancheamiento de las señales cada vez más

acusado, lo que imposibilita el análisis del espectro (Figura 116E). Esta oxidación de los núcleos metálicos tras retirarles el yoduro al cobre es la más rápida observada hasta el momento, lo que quizás evidencie que la utilización de un ligando más corto no es la estrategia más apropiada para reemplazar los yoduros una vez estos son precipitados fuera de la disolución.

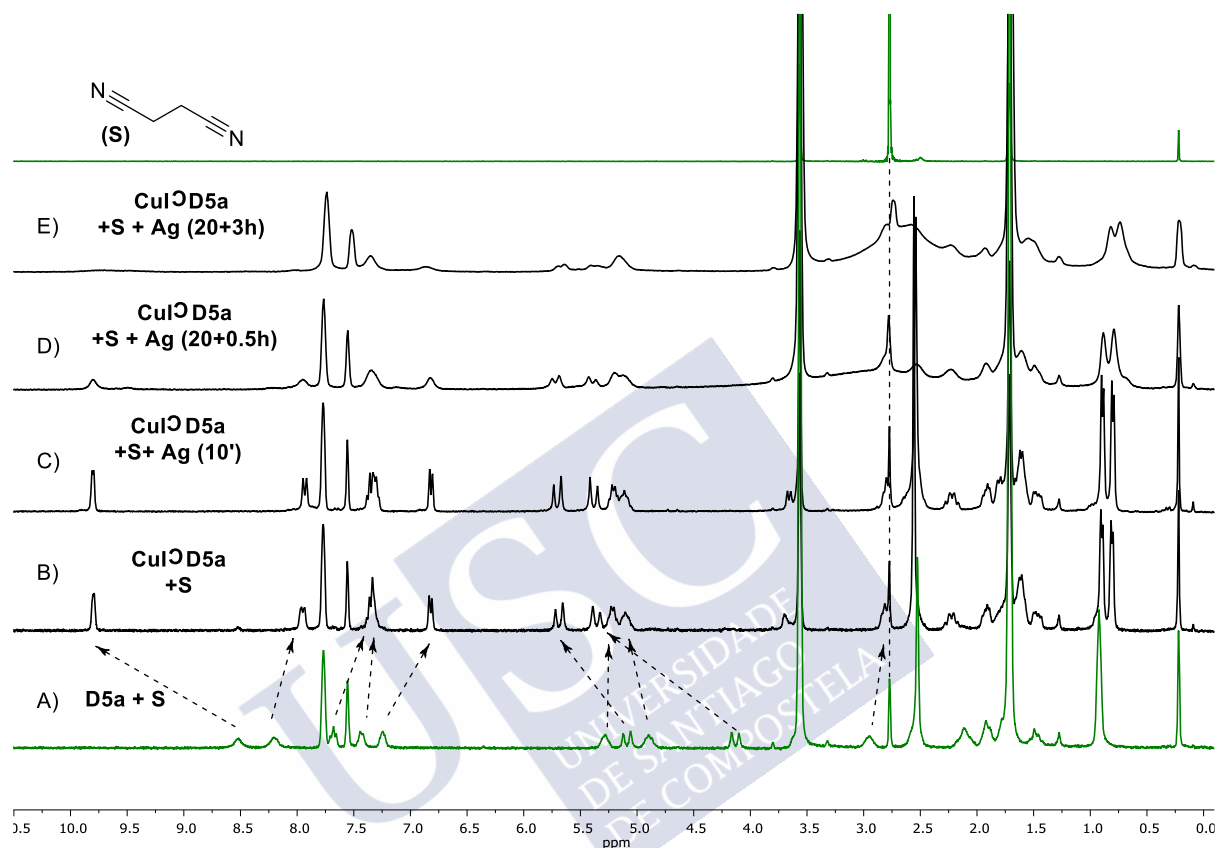


Figura 116. Espectros de protón obtenido de los experimentos de encapsulación del succinonitrilo (S) en el dímero $\text{Cu}_2\text{D5a}$.

Ante esta vía fallida, decidimos explorar nuevamente la opción de revertir una especie heterodimérica mediante el proceso de encapsulación de un ligando. Para ello, se formó el heterodímero de **CP5a** y **CP8** (**D5a-8**) en THF d_8 (ver Parte experimental) y a continuación se estudiaron las etapas de complejación de CuI y posterior precipitación de AgI en presencia de adiponitrilo y *trans*-hex-3-enodinitrilo. En ambos casos, se parte de la misma mezcla de **CP5a** y **CP8** en la que el último está presente con un ligero exceso (10-15%). En el espectro de protón (Figura 117A) se observan las señales correspondientes al heterodímero **D5a-8** y, en una menor medida, las señales residuales del homodímero **D8** (doblete a 8.60 ppm o multiplete a 4.56 ppm, por ejemplo). Sobre esta mezcla de especies diméricas se añadieron CuI (1 equiv/heterodímero), el dinitrilo (0.5 equiv) y la sal NaBARF (1 equiv). Tanto para el adiponitrilo (Figura 117B) como para su análogo insaturado (Figura 117C), la relación molar entre el complejo de coordinación $\text{CuI}\text{D5a-8}$ y la especie sin metal fue notablemente menor que la obtenida con anterioridad para el homodímero **D5a**, tal como se puede observar en la Figura 116. En presencia de

adiponitrilo la relación **CuI** : **D5a-8** : **D5a-8** fue de 1:1.9, mientras que con *trans*-hex-3-enodinitrilo en el medio la diferencia fue menor, concretamente de 1:1.4. Ambos valores difieren de los experimentos con el homodímero, donde la relación entre ambas especies con/sin CuI era mayor de 3:1. Además, se pudo observar en ambos casos que tras la adición de CuI aumentaba la proporción del homodímero **D8**, lo que sugiere una precipitación parcial de **CP5a/D5a**. Esta precipitación fue ligeramente más palpable para el ligando saturado, donde la relación entre la suma de las áreas de las especies heterodiméricas y la especie homodimérica **D8** se sitúa en torno a 2:1, mientras que en el caso del alquenodinitrilo fue de 2.5:1 (según la integración relativa entre los protones que aparecen a 9.75, 8.75 y 8.60 ppm y que se corresponden con señales del protón H₆ para las especies **CuI** : **D5a-8**, y NH de **D5a-8** y **D8**, respectivamente). Tras añadir 1 equiv de Ag(I) por mol de heterodímero (Figura 117D-E) se observó en ambos casos un comportamiento similar al obtenido en los experimentos previos con el homodímero **D5a**. Esto es, la especie **CuI** : **D5a-8** evoluciona hacia nuevas especies, en las que sospechamos que el ion Cu⁺ está libre de coordinación en su primera esfera de coordinación, y la desaparición simultánea de las señales remanentes pertenecientes al dímero **D5a-8**, que no se habían coordinado con el ion metálico en la etapa previa del experimento. La presencia de uno u otro ligando no dio lugar a grandes diferencias, observándose el desplazamiento de la señal del H₆ desde 9.76 hasta 9.43 ppm en el plazo de unas 8-10 horas como cambio más indicativo de la aparición de estas nuevas especies en disolución. Desafortunadamente, al igual que en experimentos previos, observamos que paulatinamente la precipitación del péptido, así como la oxidación del centro metálico, se hacen evidentes cuando transcurren más de 10h (Figura 117F), aunque se puede intuir que el sistema aún no ha llegado al equilibrio puesto que los picos siguen evolucionando con el paso de las horas/días.

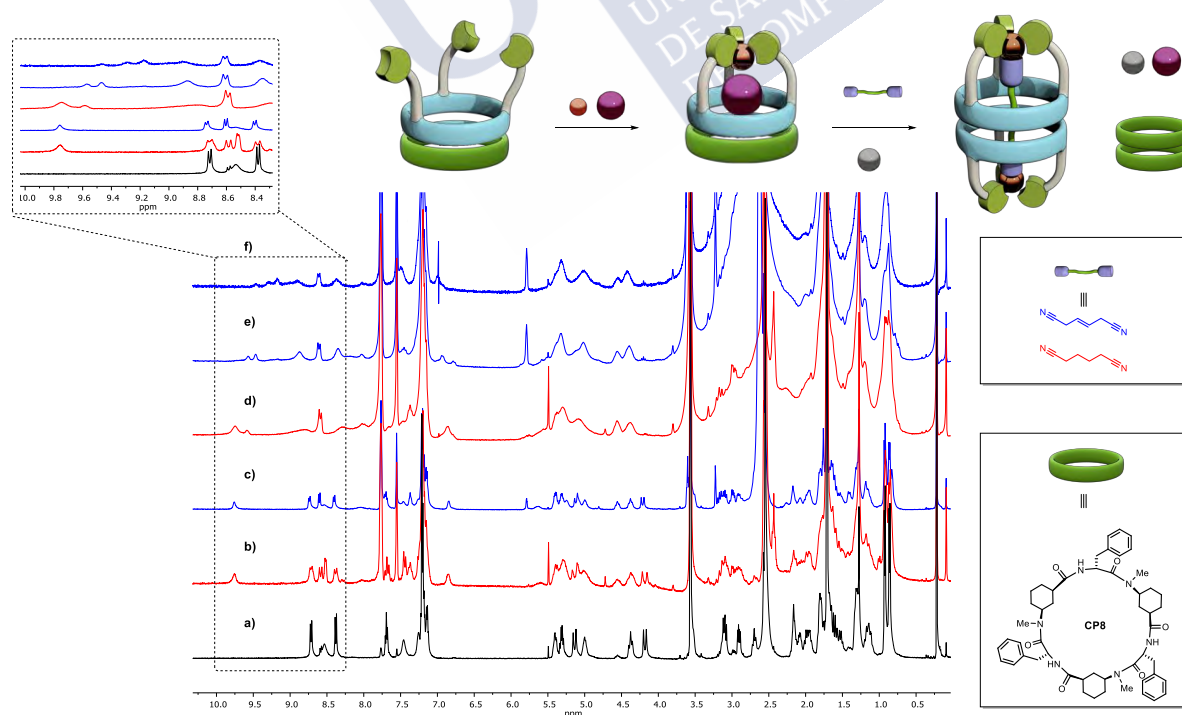


Figura 117. Espectros de ¹H RMN obtenidos en el experimento de encapsulación de dinitrilos por parte del sistema heterodimérico **D5a-8**. Las trazas en rojo corresponden a los experimentos realizados en

presencia del adiponitrilo, mientras que las azules corresponden a los experimentos con el *trans*-hex-3-enodinitrilo. Espectros correspondientes a: a) el heterodímero **D5a-8** de partida, b) y c) tras la adición de CuI, d) 1h, e) 3h y f) 24 h después de la adición de AgNO₃.

A la vista de estos resultados parece complicado aventurarse a afirmar que es posible revertir la formación de un heterodímero hacia sus respectivos homodímeros con la estrategia de encapsulación, ya que es imposible determinar si el aumento de la señal de **D8** se debe a la propia encapsulación o simplemente a que el CP que contiene las piridinas acaba precipitando en presencia de la plata, independientemente de si esté interaccionando con nitrilos bidentados o no. Lo que sí está claro es que en ningún caso parece precipitar la especie heterodimérica, ya que se siguen apreciando de manera definida las señales de **D8** todavía en la disolución de THF. Adicionalmente tampoco podemos concretar si los bisnitrilos también van precipitando a lo largo de estos experimentos.

Sorprendentemente, cuando intentamos realizar este mismo experimento con **CP9**, en el que se emplean Ala en lugar de Phe, se observaba que en ningún caso se producía una variación en las señales de las piridinas del heterodímero **D5a-9** tras la adición del CuI que indicasen una coordinación con el ion metálico, incluso en presencia de un gran exceso de la sal (>20 equiv). Carecemos de una explicación racional para esta observación empírica, puesto que una simple variación en las cadenas laterales del esqueleto peptídico no parece suficiente para evitar la complejación del metal en la vertical de la cavidad del anillo, donde los tres anillos de piridina convergerían tras la hipotética coordinación.

Ante estos resultados, decidimos modificar ligeramente la estrategia y, en lugar de utilizar la anterior aproximación de metalación con Cu (I) en dos etapas, nos decantamos por la utilización de un bisacetiluro de cobre como ligando. Concretamente, por tratamiento del 1,5-hexadiino con CuCl en EtOH se pudo aislar el 1,5-hexadiacetiluro de cobre (**G8**). Este tipo de compuestos son conocidos por presentar una baja solubilidad en los disolventes típicos, ya que su estructura es de tipo polimérico, puesto que se dan interacciones Cu-Cu.⁴⁵¹ Por ello, decidimos intentar solubilizar este complejo polimérico mediante la adición de una disolución de **CP5a** en THF *d*₈. En ningún caso, incluso tras agitar mecánicamente durante más de 15 días, se pudo apreciar un cambio de color en la disolución ni tampoco variaciones en las señales de la cápsula que sugieran algún tipo de interacción. El mismo experimento se llevó a cabo en presencia de **CP5b** con idéntico resultado.

A la luz de todos estos resultados, no podemos asegurar que la inclusión de los ligandos bidentados en el interior de la cavidad esté teniendo lugar, puesto que la relativamente rápida oxidación del centro de cobre al retirarle el contraion (que produce el anheamiento de las señales y/o la precipitación del péptido **CP5a**) limita el estudio por RMN de las especies químicas resultantes. Se ha demostrado con éxito que el **D5a** puede interaccionar satisfactoriamente con CuI y que, a la luz de los experimentos realizados, parece formar un único complejo estable en el que se mantiene la simetría del dímero (un único juego de señales). En el futuro, quizás podría ampliarse este estudio a la encapsulación de tioles o tiolatos, cuyas

⁴⁵¹ F. A. Cotton, G. Wilkinson, Advanced inorganic chemistry. 3rd Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1972, 907.

características como base blanda de Pearson quizás incrementen la afinidad por el centro de metálico con respecto a los ligandos dinitrúlicos estudiados en este capítulo.

1.2. Alquil-diamonios

En base a los resultados obtenidos con la estrategia de coordinación metálica, decidimos explorar como alternativa la aproximación de encapsulación directa de ligandos bifuncionales planteada en la introducción de este capítulo. Cabe destacar que es de sobra conocida la capacidad de los anillos de piridina para actuar como aceptores de enlace de hidrógeno, característica que ha sido explotada con anterioridad para mediar en el entrecruzamiento o la orientación de copolímeros de bloque⁴⁵² o en la preparación de receptores para moléculas relevantes biológicamente, los cuales presentan grupos guanidinio o amonio primario en su estructura, derivados de arginina y lisina, respectivamente.⁴⁵³ En ambos casos, la disposición precisa de los anillos de piridina en el espacio es clave para la obtención de la interacción deseada.

En esta línea, y aprovechando la topología privilegiada que nos ofrece el núcleo dimérico ciclopeptídico para la disposición cercana de tres unidades de piridina en cada extremo del dímero, decidimos abordar la encapsulación de moléculas lineales de alquildiamonio. El grupo amonio emergió como un buen candidato debido a la presencia de tres protones ácidos que pueden interaccionar con la tapa de manera efectiva dada la basicidad del anillo de piridina. De esta forma, estos protones (y su carga correspondiente) se encuentran repartidos entre cuatro átomos de nitrógeno (tres piridinas y la propia amina), lo que supone una ventaja termodinámica frente a una carga localizada únicamente sobre la amina primaria.

A la hora de abordar el estudio, pensamos que lo óptimo sería analizar la interacción de moléculas de diferentes longitudes con la cápsula, teniendo en cuenta que, como se comentó anteriormente, es de esperar que la distancia entre ambos grupos donadores de enlace de hidrógeno sea determinante a la hora de observar el complejo *host-guest* de encapsulación.

Desde el punto de vista práctico, las alquildiaminas lineales entre dos y doce carbonos están disponibles comercialmente y son muy asequibles, siendo alguna de ellas incluso comercial en forma doblemente protonada, como derivados de hidrocloreuro, lo que hace que se ahorre una etapa sintética. Para este estudio, la mayoría de las diaminas se adquirieron en forma de base libre y se protonaron mediante tratamiento con HCl acuoso al 10%. Puesto que estos cloruros diamónicos alquílicos no son solubles en los disolventes orgánicos apolares (CH₂Cl₂, CHCl₃, etc.) en los que pretendíamos llevar a cabo los estudios de encapsulación por RMN, se decidió realizar un proceso de intercambio iónico para sustituir los aniones cloruro (hidrofílicos), por el anión tetraarilborato voluminoso más hidrofóbico utilizado en la primera sección de este capítulo, el *tetrakis*[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato (⁻BA_{RF}). Este proceso se realizó mezclando durante 2 horas el dihidrocloreuro de partida y la sal sódica de tetraarilborato en MeOH, seguido de la precipitación de NaCl en CH₂Cl₂ y la posterior separación de esta por

⁴⁵² T. Kouketsu, M. Kakimoto, M. Jikei, S. Y. Kim, *Polym. J.* **2004**, 36, 513-518. A. R. de Luzuriaga, I. García, D. Mecerreyes, A. Etxeberria, J. A. Pomposo, *Polymer* **2010**, 51, 1335-1362.

⁴⁵³ T. W. Bell, A. B. Khasanov, M. G. B. Drew, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14092-14103.

centrifugación. Siguiendo esta metodología, se prepararon los derivados de etanodiamonio,⁴⁵⁴ butanodiamonio (**G2**), hexanodiamonio (**G3**) y octanodiamonio (**G4**) en colaboración con el Dr. H. Lionel Ozores (Figura 118).

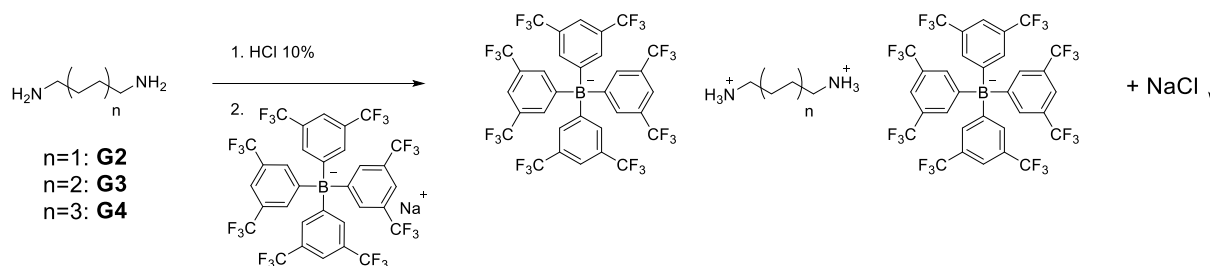


Figura 118. Esquema de la formación de los derivados diamónicos solubles en disolventes apolares.

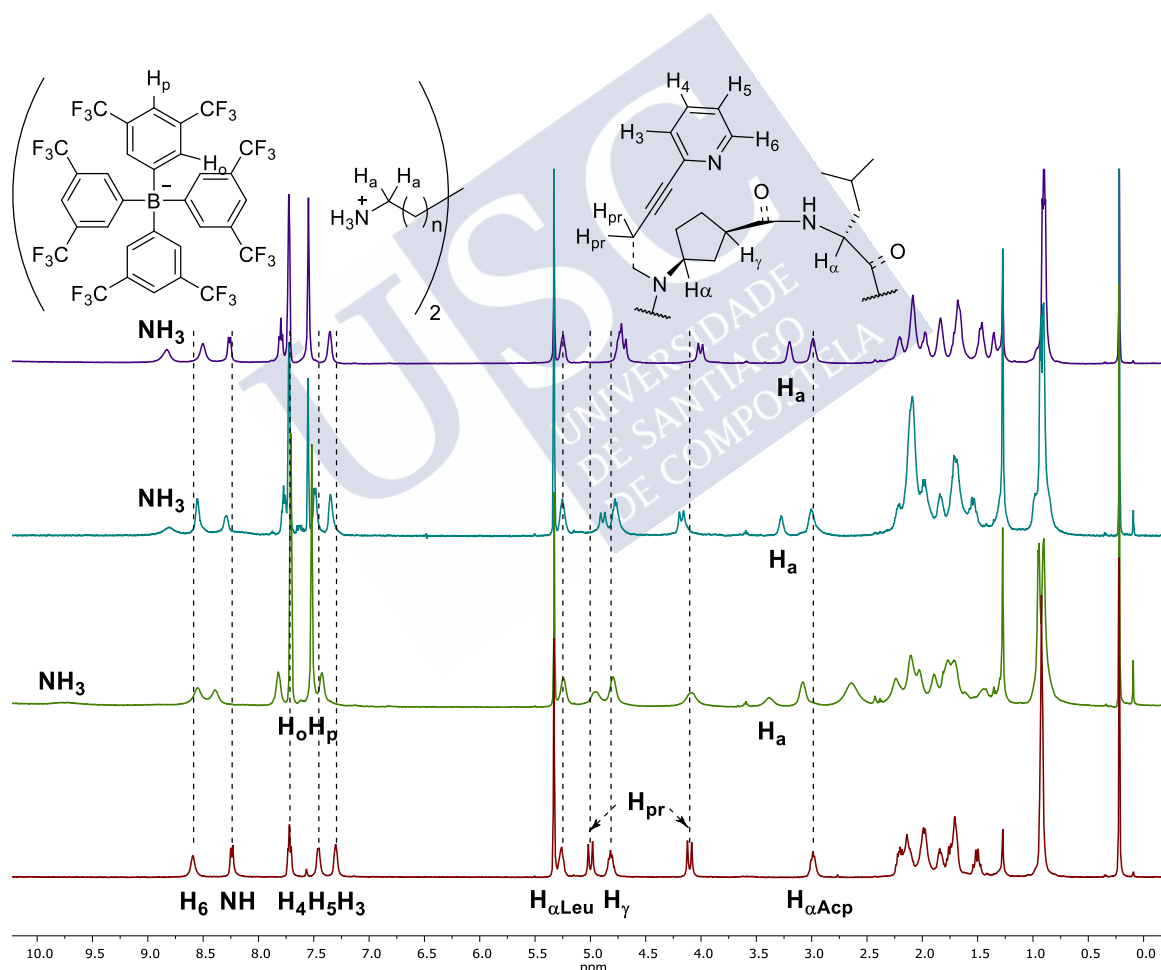


Figura 119. Espectros de ^1H RMN resultantes de la adición de 1 equiv por dímérico de **G2** (verde, $n=1$), **G3** (azul, $n=2$) y **G4** (violeta, $n=3$) sobre una disolución de **D5a** (rojo) en CD_2Cl_2 (10 mM).

⁴⁵⁴ Sustrato parcialmente insoluble en CH_2Cl_2 , se sospecha que debido a la sustitución de un único anión Cl^- por la congestión estérica; no se probó en los estudios de encapsulación.

A la hora de estudiar la interacción entre las cápsulas y los ligandos mediante espectroscopía de RMN, decidimos utilizar como disolvente el diclorometano deuterado (CD_2Cl_2). A pesar de su volatilidad y mayor coste con respecto al más habitual CDCl_3 , evitamos utilizar este último dado su marcado carácter ácido, que se acentúa con el paso del tiempo dada su descomposición lenta para dar HCl/DCl . Con esta medida se pretendía evitar una hipotética protonación parcial de alguna de las piridinas presentes en las cápsulas que complicase el análisis de estos sistemas. En primer lugar, se realizó el estudio correspondiente de nuevo con el compuesto **CP5a** (Figura 111) que presenta anillos de piridina unidos al CP por la posición *orto*, puesto que la disposición de los átomos de nitrógeno, apuntando directamente hacia la cavidad del dímero, hacía pensar en una mayor facilidad para los procesos de internalización. Se decidió mezclar cantidades equimolares de las diferentes sales con esta cápsula a una concentración de 10 mM y se estudió la variación en los desplazamientos químicos de las señales de la cápsula (Tabla 2) y de los ligandos (Tabla 3) con respecto a las señales de ambos componentes puros (Figura 119). A pesar de que los cambios en las señales del péptido no son, en la mayoría de los casos, muy notables, parece que en alguna de ellas existe una tendencia entre la magnitud de su variación y la longitud del guest con el que interactúan. De esta manera, los protones H_6 , H_γ y H_{pr} sufren un desplazamiento progresivo a campo alto a medida que la longitud aumenta, siendo en este último donde la variación es mayor ($\Delta\delta=0.45$ ppm para **G4**). Por otro lado, algunas señales (H_5 , H_4 , NH) sufren cambios leves, pero no parece existir ninguna correlación aparente con la longitud del ligando que esté presente en el experimento. En el caso de los diamonios, en todos los casos se observa un fuerte desapantallamiento de los protones del grupo amonio, lo que puede ser debido a la formación esperada de enlaces de hidrógeno con los residuos de piridina. Para todos ellos se observó un cierto ancheamiento o pérdida de definición en las señales, que fue más acusado en el caso del ligando más corto **G2**.

Señal	H_6	NH	H_4	H_5	H_3	$\text{H}_{\alpha\text{Leu}}$	$\text{H}_{\gamma\text{Acp}}$	H_{pr}	$\text{H}_{\alpha\text{Acp}}$
Guest									
-	8.60	8.23	7.73	7.45	7.31	5.29	4.81	5.00 4.10	2.97
G2	8.57	8.41	7.83	7.54	7.34	5.27	4.82	5.00 4.13	3.09
G3	8.49	8.30	7.82	7.54	7.38	5.26	4.74	4.74 4.03	3.00
G4	8.45	8.24	7.84	7.56	7.37	5.25	4.69	4.55 3.95	2.99

Tabla 2. Desplazamientos químicos (ppm) de las señales representativas de la cápsula **D5a** observados tras la adición de 1 equiv de las sales de diamonio **G2**, **G3** y **G4**. En la primera fila (-) se muestran los desplazamientos para el anfitrión **D5a** puro.

Señal ⁴⁵⁵	NH ₃ ⁺	H _a	H _b	H _c	H _d
Especie					
G2	7.13	3.13	1.77	-	-
G2⊃D5a	9.81	3.40	1.90	-	-
G3	6.69	3.13	1.69	1.37	-
G3⊃D5a	8.97	3.30	1.94	1.61	-
G4	6.41	3.21	1.71	1.31	1.31
G4⊃D5a	8.80	3.24	1.84	1.46	1.35

Tabla 3. Desplazamientos químicos (ppm) de las señales más características de los ligandos de alquildiamonio en su forma libre y tras su adición sobre 1 equivalente de la cápsula de piridinas **D5a**.

Con el objetivo de comprender mejor este proceso de interacción/encapsulación decidimos analizar por DOSY las muestras anteriores para comprobar si se producían variaciones en su coeficiente de difusión, y por tanto en el tamaño de las especies, al modificar la concentración de las muestras y al compararlos con los valores calculados para la cápsula pura. Para ello, a partir de las muestras más concentradas (10 mM), se prepararon otras a 5 y 2 mM (Figura 120). Las medidas de difusión se realizaron por duplicado (o triplicado) en presencia del patrón estándar TMSS, de manera análoga al procedimiento descrito en el Capítulo I de esta memoria (Figura 121)

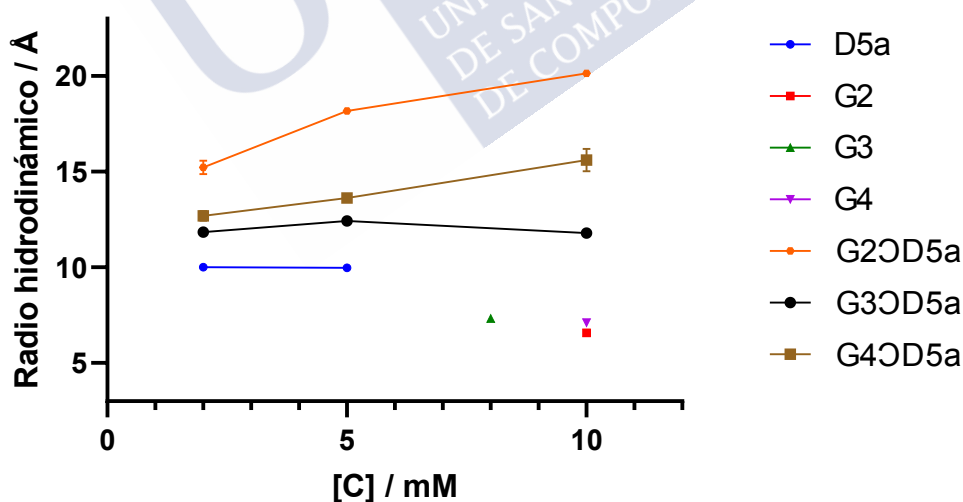


Figura 120. Variación del radio hidrodinámico de los sistemas *host-guest* diamónicos con la concentración de las muestras.

⁴⁵⁵ H_b se corresponde con la posición β al grupo amonio, H_c a la posición γ y H_d a la posición δ .

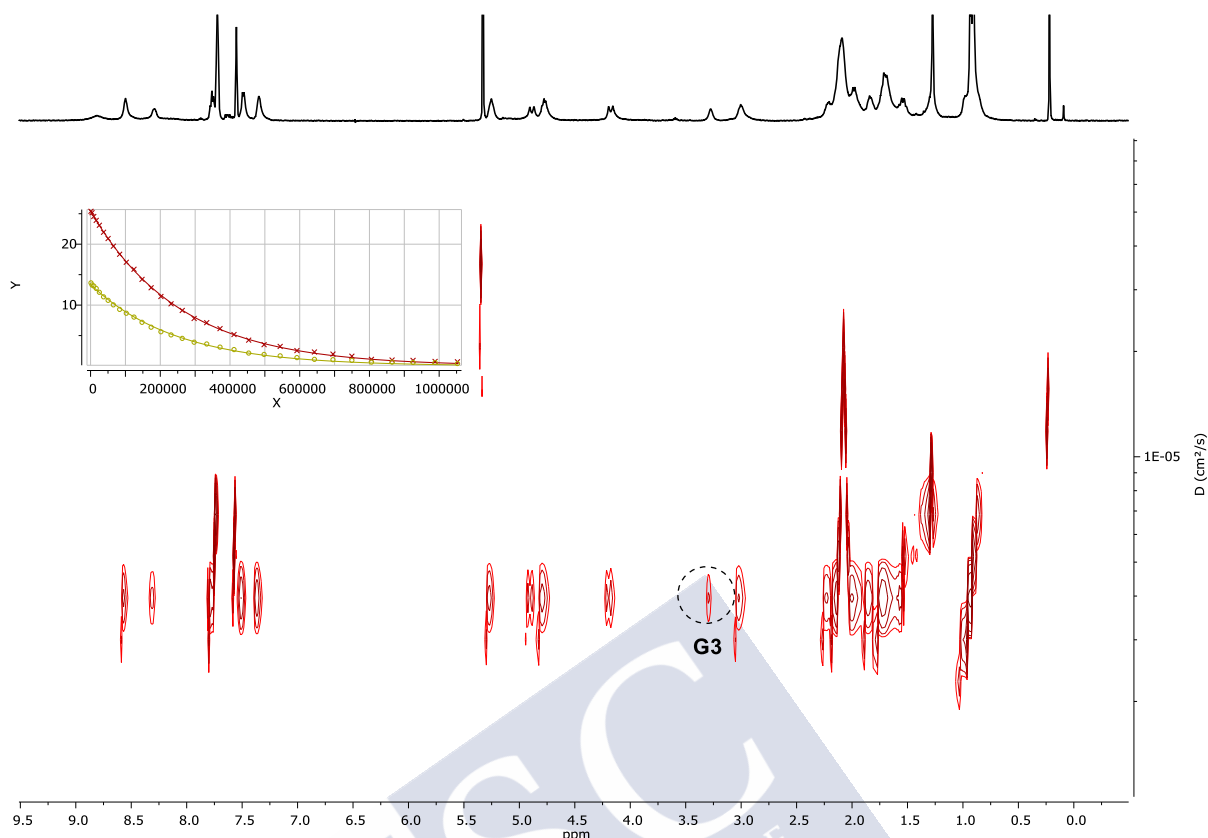


Figura 121. Experimento DOSY de **G3** \supset **D5a** en el que se puede apreciar la migración de las señales del péptido y **G3** en la misma banda de difusión. En la gráfica de decaimiento monoexponencial (parte superior izquierda) de las señales se muestra en rojo la curva correspondiente a la señal del péptido y en marrón a la señal indicada de **G3**.

De manera paralela al anterior estudio de DOSY, Martín Calvelo y la Dra. Rebeca García Fandiño, expertos del grupo en cálculos teóricos, llevaron a cabo unos estudios computacionales con **D5a** y los ligandos **G2-G4** estudiados por DOSY (complejos **G2** \supset **D5a**, **G3** \supset **D5a** y **G4** \supset **D5a**). También se modeló un cuarto ligando (**G5**) cuya longitud es intermedia entre **G3** y **G4** ya que los grupos amonio están separados por siete átomos de carbono. En primer lugar, se minimizaron las estructuras de los complejos utilizando un método semiempírico, PM7, en el programa MOPAC.⁴⁵⁶ A continuación, se obtuvo la *binding energy*⁴⁵⁷ de cada sistema mediante un cálculo *Counterpoise*, corrigiendo el BSSE (Error de superposición de base), con un nivel de teoría mayor, DFT, utilizando el programa Gaussian09.⁴⁵⁸ Estos cálculos se llevaron a cabo con B3LYP como funcional y 6-31G(d) como base. Los resultados predicen que la encapsulación del hexanodiamonio **G3** es el proceso más favorable, en base a los valores de energía que arroja el programa (ver Parte Experimental). El

⁴⁵⁶ MOPAC2016, J. J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs CO, USA, <http://OpenMOPAC.net> (2016).

⁴⁵⁷ Este parámetro determina la diferencia de energía entre el sistema completo (cápsula + ligando) y la energía de cada componente por separado con la geometría aislada, por lo que se tiene en consideración la energía de relajación que se genera al tener que modificar las estructuras de los componentes para interaccionar.

⁴⁵⁸ Gaussian 09, Revision A.02, D. J. Fox *et al.*, Gaussian, Inc., Wallingford, (2016).

hecho de que el ligando **G5**, con un número de átomos impar, de lugar a los resultados con la energía de interacción menos favorable, y en vista de la estructura optimizada obtenida (Figura 122, centro), sugiere que el huésped se ve forzado a adoptar una conformación poco favorable, en la que la cadena está retorcida en una conformación parcialmente eclipsada. Esta observación se contrapone al resultado obtenido con los ligandos con número par de átomos, que pueden desplegar su conformación completamente extendida (conformación en zigzag). Además, los grupos amonio en el caso de los ligandos con un número par de átomos quedan situados en el centro del anfitrión facilitando las interacciones con las tres piridinas, mientras que en el ligando impar estos grupos se disponen con orientaciones diferentes.

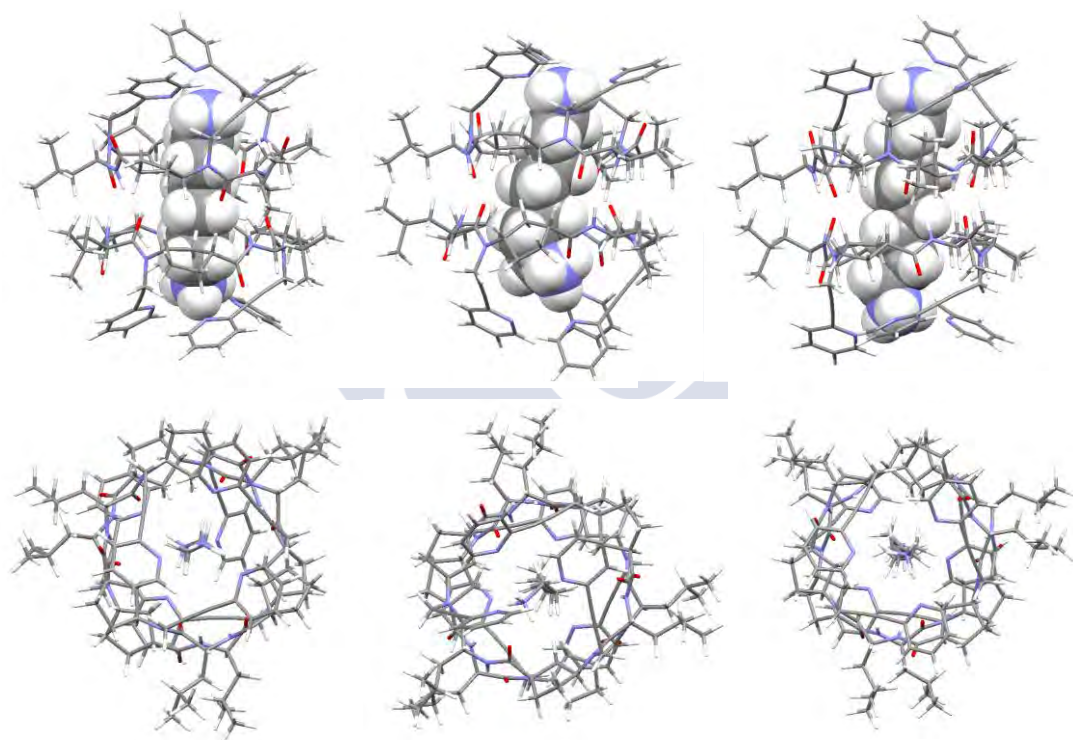


Figura 122. Arriba: vista lateral de las estructuras minimizadas de los complejos catiónicos **G3@D5a** (izquierda), **G5@D5a** (centro) y **G4@D5a** (derecha), en los que el dímero de **CP5a** se representa mediante listones mientras que los ligandos encapsulados aparecen representados como modelos CPK. Abajo: vista superior empleando la representación mediante listones para ambas especies.

Estos resultados, son coincidentes con las observaciones llevadas a cabo mediante DOSY. Como era previsible, cuanto más se adapte el tamaño del ligando en una conformación extendida al de la cavidad, más favorable entálpicamente será la interacción. Además, la ubicación de los grupos amonio en el centro de la boca de la cavidad, observada en los complejos con ligandos pares, facilita la formación simultánea de tres enlaces de hidrógeno con las piridinas de ambos ciclopeptidos. En el caso del **G5@D5a** solo uno de los amonios es capaz de formar los tres enlaces de hidrógeno (distancias $N_{\text{pyr}}\text{-H}$ 1.898, 1.893, 1.919 Å), mientras que en el caso del segundo solo se observa la formación del enlace de hidrógeno con una de las piridinas (distancia $N_{\text{pyr}}\text{-H}$ 2.015 Å). En el caso de los otros dos ligandos, las distancias $N_{\text{pyr}}\text{-H}$

oscilan entre 1.86 Å y 2.03 Å, compatibles con la interacción deseada. La estructura resultante del complejo **G4**⊃**D5a** muestra que el ligando parece ser demasiado largo por lo que se retuerce apartándose de la conformación extendida y, por tanto, incrementando las tensiones torsionales al igual que sucedía con las cápsulas de Rebek descritas en la Introducción.²³

Si la fuerza motora que dirige la encapsulación de los ligandos no es lo suficientemente favorable, es probable que haya una cierta tendencia a la complejación por la parte externa del anillo ciclopeptídico, lo que generaría inequívocamente redes supramoleculares con el consiguiente incremento del tamaño aparente de las especies observadas en disolución. Además, este fenómeno también propicia la reducción de la difusión al aumentar la concentración de los sustratos, puesto que a mayor concentración más se favorecen los procesos intermoleculares. Este fenómeno sucede claramente con **G2**, el cual es demasiado corto como para alcanzar simultáneamente los dos extremos de la cápsula y que, por tanto, debe estar abocado a interaccionar formando redes. Por otro lado, esto mismo también sucede, aunque en menor medida, con **G4**, para el que los cálculos sugieren la existencia de una cierta penalización por exceder la longitud óptima, la cual podría explicar la tendencia observada en los experimentos DOSY a agregar a media que se aumenta la concentración del complejo.

Desafortunadamente, no fue posible encontrar ningún pico de cruce en experimentos bidimensionales de NOESY o ROESY entre los protones alquílicos internos de los diamonios y los protones proyectados hacia la cavidad de la cápsula; a saber, los de la posición β ecuatorial del anillo de Acp. A decir verdad, es imposible determinar si existe esta señal de cruce, ya que en el caso de **G3**⊃**D5a** se produce un solapamiento entre las señales de los protones del ligando de las posiciones *b* y *c* (Tabla 3) con las señales del anillo de Acp, que imposibilitan dilucidar si lo que se observa es un efecto nOe o un simple acoplamiento escalar entre los protones del anillo de γ-Aa (ver Parte Experimental, Figure 15).

Para intentar subsanar este problema, nos planteamos la síntesis de un compuesto análogo al, a priori, mejor candidato (**G3**), pero que contuviese algún elemento adicional a la hora de determinar la encapsulación inequívocamente por RMN. La elección no era trivial, ya que la cavidad es relativamente estrecha y, además, sabíamos por el estudio computacional que la introducción de algún doble enlace podría dar lugar a una incorrecta orientación relativa de los amonios, causando un mayor número de interacciones *syn* y *gauche* con la consiguiente desestabilización de la especie encapsulada. Por ello nos decidimos a sintetizar el 2,2,3,3,4,4,5,5-octafluorohexano-1,6-diamonio **G6** (Figura 123). Esperábamos que la sustitución de ocho átomos de hidrógeno en las posiciones internas por otros tantos de flúor no supusiese un gran hándicap en términos estéricos y/o electrónicos, dado su fuerte carácter atractor de electrones que reduce la basicidad de la amina. Confiábamos en que la presencia de un nuevo núcleo activo en RMN (¹⁹F) nos permitiese tener información adicional para corroborar la localización de este nuevo *guest*. La síntesis de la diamina precursora a partir del compuesto comercial 2,2,3,3,4,4,5,5-octafluorohexano-1,6-diol estaba descrita en bibliografía⁴⁵⁹ y constaba de tres etapas sintéticas: la formación del ditriflato, una doble sustitución nucleófila con ion azida y la posterior reducción a aminas. Tal como se ilustra en la Figura 123, **G6** se obtuvo, tras el consiguiente intercambio de contraion con un rendimiento global del 3%.

²³ D. Ajami, L. Liu, J. Rebek Jr., *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 490-499.

⁴⁵⁹ X. Wu, E. Boz, A. M. Sirkis, A. Y. Chang, T. J. Williams, *J. Fluorine Chem.* **2012**, 135, 292-302.

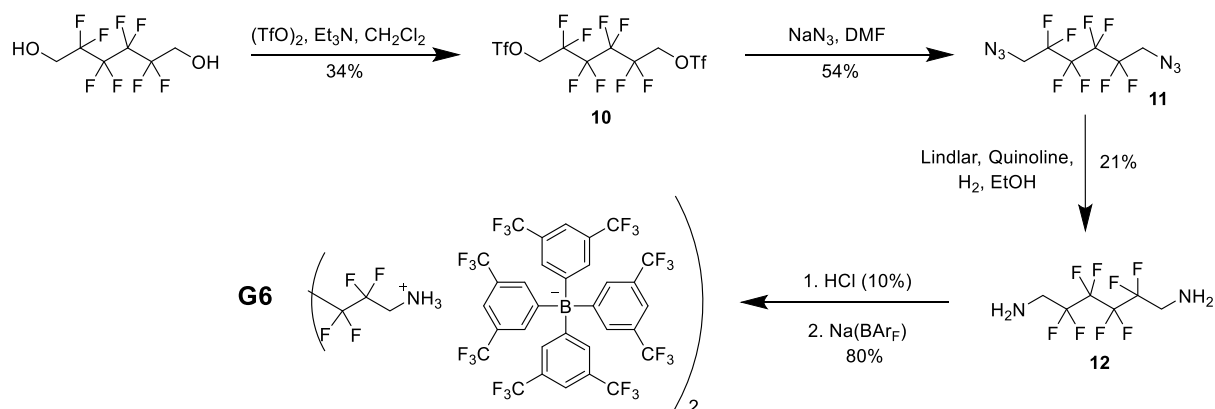


Figura 123. Ruta sintética para la obtención de **G6**.

En este caso, llevamos a cabo una valoración más detallada del proceso de interacción entre **G6** y **CP5a**, añadiendo cantidades crecientes del primero sobre una disolución del segundo en CD_2Cl_2 (5 mM) (Figura 124, arriba). Como se puede apreciar, los cambios más significativos se producen en uno de los protones propargílicos, que se apantalla notablemente ($\Delta\delta = -0.37$ ppm), así como en las señales aromáticas, donde el comportamiento general es que se produzca un desplazamiento a campo bajo de los protones aromáticos de las piridinas, siendo el cambio más profundo para los tripletes correspondientes a H_4 y H_5 ($\Delta\delta = 0.23$ ppm). Es de destacar que la variación en este caso es más acusada que en el caso de los ligandos tipo hidrocarburo estudiados previamente. También es reseñable que los protones en alfa a los grupos amonio se apantallan ($\Delta\delta = -0.13$ ppm) cuando dicho compuesto se encuentra mezclado con **D5a**. En el espectro de ^{19}F (Figura 124, abajo), llevado a cabo en presencia de hexafluorobenceno como patrón interno, también se producen variaciones en las señales del ligando dependiendo de si está solo o en presencia del CP. Las dos señales que identifican a los flúores F_b y F_c resuenan a -122.0 y -118.0 ppm, frente a los -121.0 y -116.0 a los que aparecen cuando el ligando se encuentra libre.

Dados los indicios de interacción, llevamos a cabo los experimentos DOSY para determinar si los valores de difusión del ligando y la capsula coincidían (Figura 125). A diferencia de los estudios previos con alcanodiamonios, en este caso se observaban dos bandas de migración claramente diferentes para el núcleo de diamonio de **G6** (señal a 3.65 ppm) y para las señales del péptido, que difunden más lento al ser de mayor tamaño. No obstante, esta observación no implica que se no se esté produciendo la interacción entre ambas especies. Esta diferencia también se podría observar como consecuencia de que la constante de encapsulación, K_a , sea menor que las de los casos previamente estudiados.

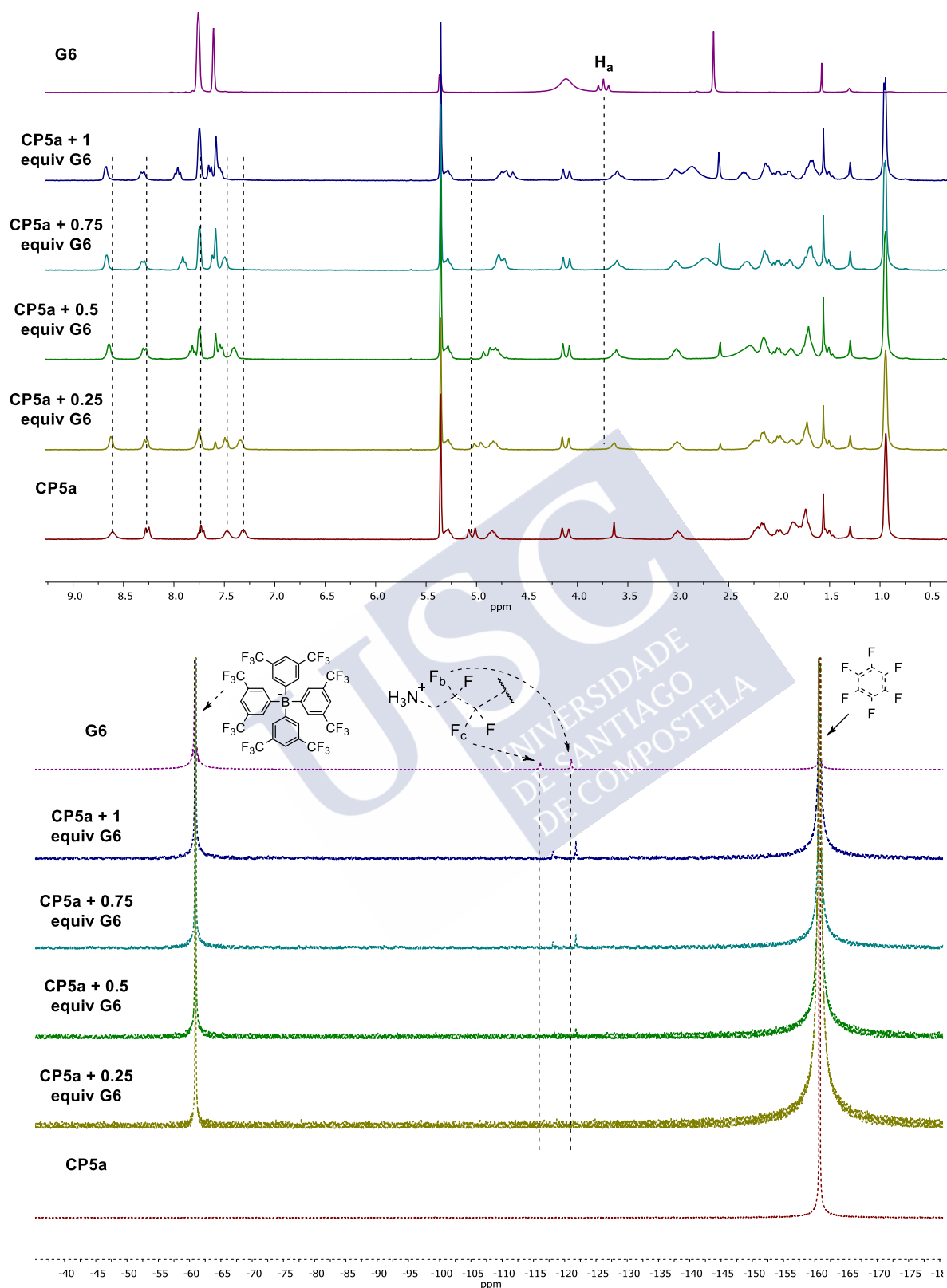


Figura 124. ^1H RMN (arriba) y ^{19}F RMN (abajo) de la valoración de **CP5a** con cantidades crecientes de **G6**, donde se aprecia la variación de los desplazamientos químicos de las señales más representativas.

A pesar de que, *a priori*, es de esperar que la fortaleza del enlace de hidrógeno aumente con la acidez del protón sobre la amina primaria, es posible que, si esta acidez supera un cierto límite, se pierda la fuerza impulsora de la encapsulación, ya que se protonarían de forma preferente las piridinas de la cápsula frente al grupo amonio del *guest*. En nuestro caso, es difícil predecir hasta qué punto el efecto inductivo que ejercen los grupos CF_2 disminuye lo suficiente la basicidad de la amina primaria (incrementa el carácter ácido del protón amónico) como para observar este proceso, aunque no es descartable. En el caso de experimentos de difusión en RMN con el complejo **G6** \rightarrow **CP5a**, en el cual **G6** se encuentra en equilibrio rápido entre la forma unida y libre, el valor resultante de difusión obtenido (D_{obs}) se debe a la contribución ponderada de la especie encapsulada (D_{HG}) y del ligando libre (D_{G}).⁴⁶⁰ De esta manera, es posible obtener la fracción molar de moléculas de **G6** que están formando el complejo en el equilibrio (X_{HG}) (Ec. 7) y a partir de este parámetro obtener un valor aproximado de la K_a según se ilustra en la Ec. 8 (procedimiento detallado en Parte Experimental, Sección 3.4).⁴⁶¹

$$D_{\text{obs}} = X_{\text{HG}} \cdot D_{\text{HG}} + (1 - X_{\text{HG}}) \cdot D_{\text{G}} \quad (7)$$

$$K_a = \frac{X_{\text{HG}}}{[C]_i \cdot (1 - X_{\text{HG}})^2} \quad (8)$$

A la hora de determinar los valores de difusión de las especies puras D_{HG} y D_{G} hay que tener en cuenta varias consideraciones previas. En cuanto a la difusión del ligando diamónico puro, es posible determinarla en un experimento independiente (el valor se representa mediante una línea punteada azul en la Figura 125). Sin embargo, en cuanto al valor de D_{HG} , es habitual considerar que, al tratarse de un proceso de encapsulación, la difusión (el tamaño) del complejo HG es igual a la de la cápsula libre (línea de difusión de **CP5a** en la Figura 125). En el caso particular de nuestro sistema, sabemos por los estudios previos (Figura 120) la difusión del **CP5a** puro y además observamos para el ligando de seis carbonos (**G3**), como en este caso, un ligero aumento del tamaño (en torno 15-20%) tras la complejación de los diamonios. A la hora de escoger un valor de D_{HG} de entre esas opciones, nos decantamos por utilizar el valor de difusión obtenido para las señales del péptido en el mismo experimento del que obtenemos el valor D_{obs} , que es lo que se suele hacer habitualmente en este tipo de sistemas. De esta forma, mediante el uso de la Ecuación 8 se obtuvo una K_a de 479 M^{-1} , lo que implica que en las condiciones estudiadas (5 mM de **G6** \rightarrow **CP5a**) aproximadamente la mitad de las moléculas del ligando están formando parte del complejo en equilibrio con la especie libre.

⁴⁶⁰ L. Avran, Y. Cohen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 586-602.

⁴⁶¹ L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.

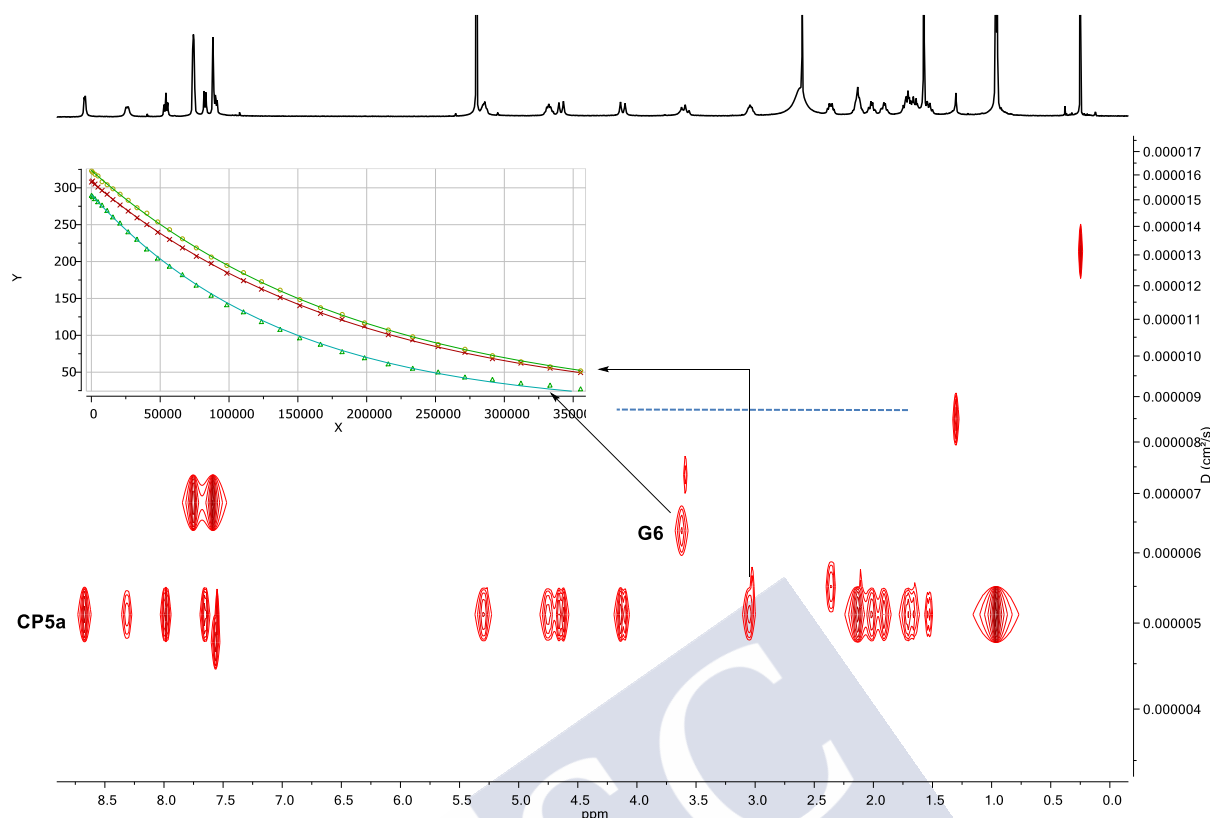


Figura 125. Experimento de DOSY tras la adición de 1 equiv de **G6** sobre una disolución de **CP5a** en CD_2Cl_2 (5 mM), donde se aprecia claramente la aparición de bandas de difusión independientes para el dímero **D5a**, el diamonio y el contraión de arilborato correspondiente.

Con el objetivo de confirmar la encapsulación a través de la cavidad del dímero, decidimos llevar a cabo experimento de HOESY⁴⁶² sobre el sistema **G6**⊃**CP5a**. Desafortunadamente, no fue posible encontrar ningún pico de cruce entre los núcleos de ^{19}F presentes en el ligando diamónico y alguno de los protones del CP que apuntan hacia la cavidad (especialmente los protones sobre el carbono β del Acp). A pesar de que la ausencia de señal no implica una falta de proximidad entre ambas especies, este resultado impide corroborar inequívocamente nuestra hipótesis de que ambas moléculas interactúan a través de la cavidad de la cápsula definida por **D5a**.

Para evaluar de manera cualitativa la constante de asociación entre **G3** y **D5a**, que presentan la misma banda de difusión (Figura 121), decidimos intentar utilizar las propiedades previamente estudiadas en la que péptidos de este tipo prefieren formar heterodímeros con CP basados en Ach frente a la formación de los correspondientes homodímeros.⁴⁶³ La idea consiste en revertir la formación del complejo **G3**⊃**D5a** mediante la formación del heterodímero, de tal manera que este proceso pudiese aportar información sobre la interacción de **CP5a** con el ligando de diamonio. Como ya hemos comentado en el Capítulo I, si se mezcla un CP formado por Acp con otro equivalente (homoquiral y con el mismo número de residuos) de Ach, el

⁴⁶² El experimento de HOESY es análogo al experimento NOESY, pero, a diferencia de este último, se emplea para estudiar la proximidad entre núcleos magnéticos diferentes (^{19}F – ^1H).

⁴⁶³ M. Panciera, M. Amorín, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10260-10265.

heterodímero de ambos se forma preferentemente sobre los homodímeros, con una mejora en la K_a . Conociendo este fenómeno, planteamos que la encapsulación de un ligando ditópico, a raíz del efecto quelato, podría ser una fuerza impulsora suficiente para, a partir de un heterodímero (**D5a-8**) que contenga **CP5a** y otro péptido con residuos de Ach (**CP8**, Figura 111), formar selectivamente el homodímero con dos tapas de piridinas conteniendo el ligando en cuestión. Cabe destacar que esta estrategia ha sido utilizada con éxito con anterioridad en el grupo de investigación, utilizando dímeros de α,γ -CP cerrados por porfirinas,⁴⁶⁴ compuestos análogos a los que serán descritos en la Sección 2 de este capítulo.

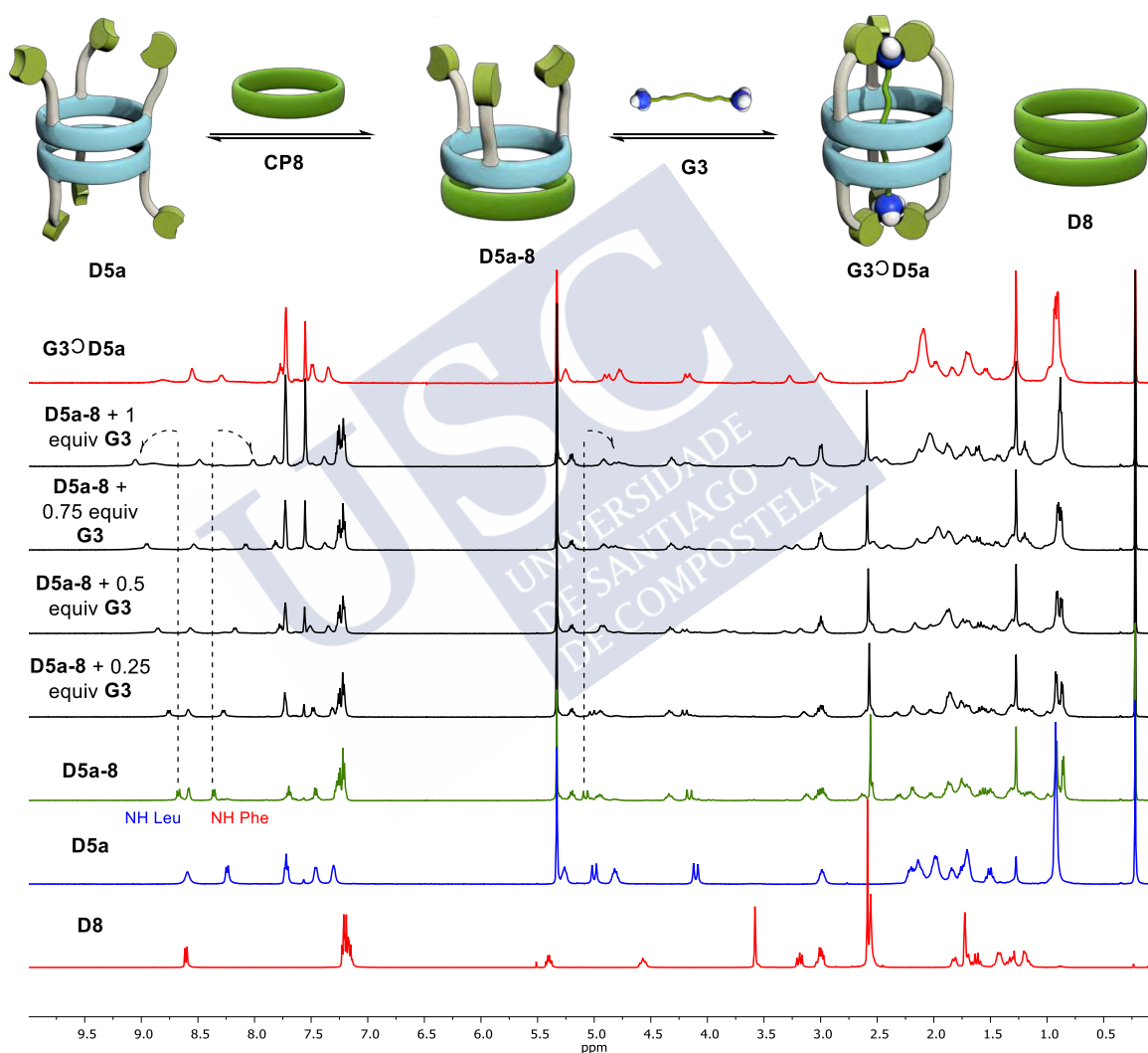


Figura 126. Arriba: esquema de la formación y posterior desensamblaje de las especies heterodiméricas, donde el anillo verde representa el CP que contiene Ach (en este caso **CP8**). Espectros de protón correspondientes con la valoración de **D5a-8** (traza verde) con cantidades crecientes (0.25, 0.5, 0.75 y

⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 776-784.

1.0 equiv) de **G3** (trazas en negro). Experimento realizado en CD_2Cl_2 a una concentración 5 mM de heterodímero.

En esta línea, decimos formar el heterodímero **D5a-8** para lo cual se preparó el CP $c\text{-}[(D\text{-Phe-}^{Me}N\text{-}L\text{-Ach})_3]$ (**CP8**). En este punto, solo era necesario preparar una mezcla equimolecular de ambos péptidos, tal como se puede apreciar en los espectros de RMN de protón que se ilustran en la Figura 126 (el proceso de formación del heterodímero **D5a-8** detallado se encuentra en la Parte Experimental). Claramente, se observa la aparición de una serie de nuevas señales (especialmente en los protones amídicos) correspondientes con la especie heterodimérica. A continuación, se añadieron cantidades crecientes de **G3** y se estudiaron los cambios en los espectros de protón de las especies resultantes con el fin de observar la formación del complejo **G3** \rightarrow **D5a** y del homodímero **D8** (Figura 126). Como se puede observar, las sucesivas adiciones de **G3** provocan unos claros cambios en los desplazamientos químicos de algunas de las señales características del heterodímero. Sin embargo, el espectro resultante tras la última adición no se corresponde con el hipotético sumatorio de los espectros de **D8** y **G3** \rightarrow **D5a** (extremos superior e inferior de la Figura 126, en rojo). Por el contrario, se produce una evolución hacia una nueva especie cuyos picos cruzados observados en el espectro nOe se corresponden con las de una especie heterodimérica (se siguen observando picos de cruce en el nOe entre protones $\gamma\text{-Acp}$ y $\alpha\text{-Ach}$ y viceversa, Figura 127). Las señales más afectadas por la adición del diamonio son los protones amídicos de las leucinas de **CP5a** y las fenilalaninas de **CP8** ($\Delta\delta=0.38$ ppm y -0.33 ppm, respectivamente). También se observan pequeñas variaciones en las señales de las piridinas o los grupos propargílicos, cuyos cambios son bastante parecidos en magnitud a los observados en los experimentos de adición sobre la disolución de **CP5a** puro (Figura 119).

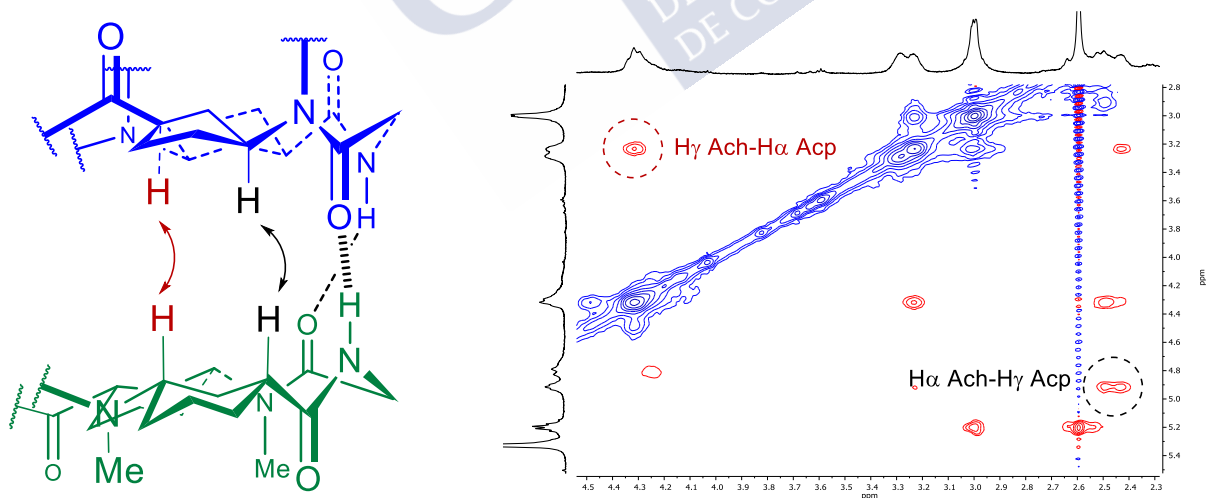


Figura 127. Aparición de los picos de cruce característicos de la presencia de heterodímero en la muestra **D5a-8** + 1 equiv **G3** (Figura 126). Las cadenas laterales de los $\alpha\text{-Aa}$ se han omitido por claridad.

Ante este sorprendente resultado, decidimos comprobar si la introducción en el sistema de grupos aromáticos (Phe de **CP8**) pudiera ser la causa de estos inesperados cambios en los

desplazamientos químicos de las señales de los NHs asociada a una aparente incapacidad para revertir el equilibrio desde la especie heterodimérica hacia las homodiméricas. Por ello, decidimos, comprobar el efecto que tenía la incorporación sobre una disolución de **CP8** de 1 equiv de **G3** (ver Figure 17, Parte Experimental). Observamos que se producían cambios notables en el espectro de ^1H RMN en CD_2Cl_2 , en donde se desdoblán claramente los protones aromáticos de las cadenas laterales y los NH, que están involucrados en la formación de enlace de hidrógeno, sufren un anchemiento muy acusado, llegando prácticamente a no apreciarse sobre la línea base. Este fenómeno pone de manifiesto que quizás la elección de **CP8** como CP complementario para formar el heterodímero no es la más apropiada, ya que las interacciones que se dan (bien amonio- π o arilborato- π) pueden dar lugar a artefactos que compliquen el análisis del proceso de equilibrio entre el complejo de inclusión y los dímeros (homo/hetero).

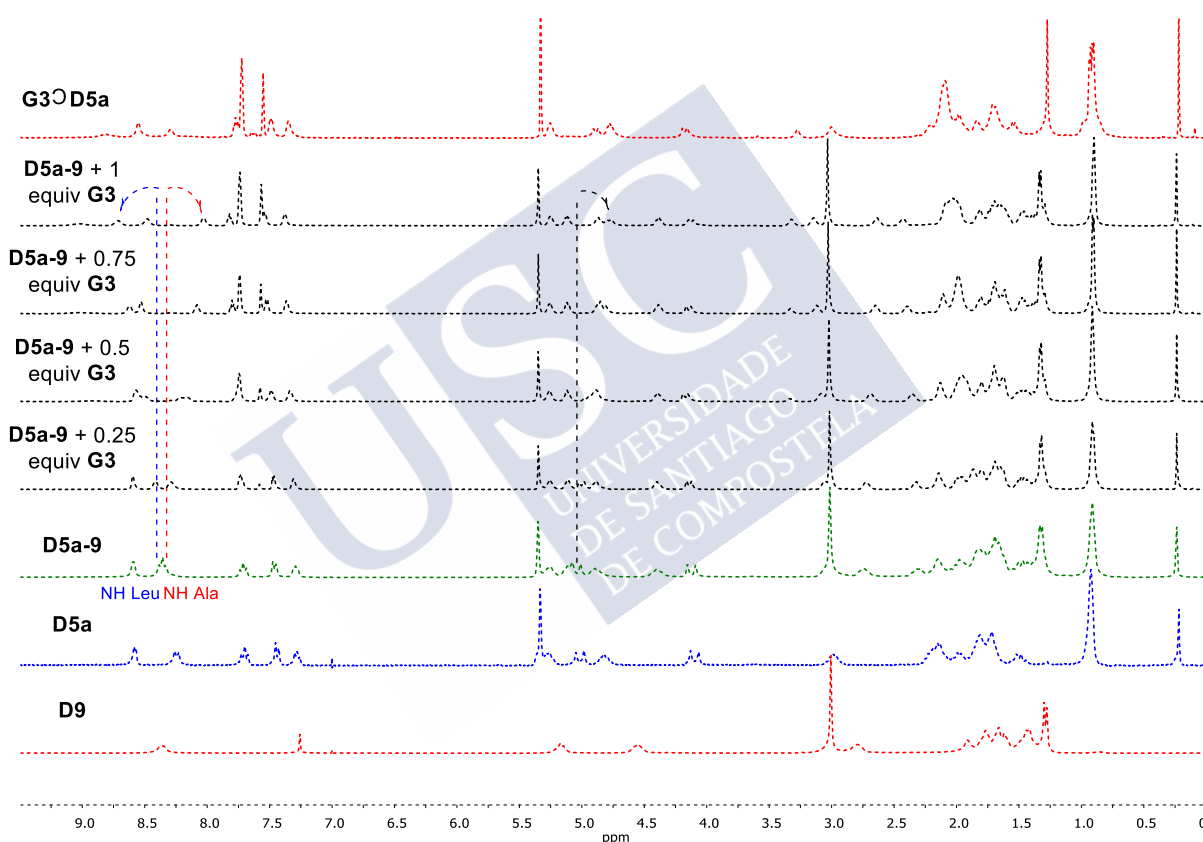


Figura 128. Espectros de protón correspondientes con la valoración de **D5a-9** (verde) con cantidades crecientes (0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 equiv) de **G3** (trazas en negro). Estos experimentos se realizaron en CD_2Cl_2 a una concentración 5 mM de heterodímero.

Para eliminar esta nueva variable e imposibilitar la posible interacción a través de los anillos aromáticos, decidimos preparar un nuevo péptido cíclico, concretamente el *c*-[(*D*-Ala-*MeN*-*L*-Ach)₃] (**CP9**, Figura 111), en el que los anillos aromáticos de las Phe se sustitúan por Ala, que no deberían interaccionar con el anión. Tras formar el heterodímero (ver Figure 11, Parte Experimental), se procedió con las adiciones de diferentes porciones de **G3** hasta llegar al punto de equivalencia (1 equiv de **G3** por 1 equiv de **D5a-9**), tal como se muestra en la Figura

128. Como se puede apreciar en la Figura 128, el comportamiento de este sistema heterodimérico es completamente análogo al estudiado anteriormente, donde los mayores desplazamientos se observan para las señales de uno de protones propargílicos (5.05 a 4.78 ppm) y los de los protones del esqueleto peptídico de ambos CPs. Queda claro que el punto final de la valoración no se asemeja a las respectivas especies homodiméricas de **D9** y encapsulada de **G3**⊃**D5a** (en rojo). Los experimentos de RMN (TOCSY, NOESY, ROESY) o de masas realizados no nos permitieron determinar la naturaleza de la nueva especie que se forma. De los experimentos de RMN solo podemos afirmar que sigue habiendo apilamiento de los esqueletos peptídicos de los dos CPs como se deduce de las señales de nOe ya comentados en el caso anterior (Figura 127). Para corroborar que no nos encontrásemos ante un fenómeno cinético o la formación de un mínimo local, diseñamos el experimento de manera inversa; es decir, nos planteamos qué sucedería si añadiésemos el ciclopéptido complementario de Ach sobre la especie ya complejada **G3**⊃**D5a** previamente formada. En la Figura 129 se ilustran los RMNs de protón resultantes de este experimento, donde se puede observar que el punto final de la valoración usando ambas alternativas; adición de ligando sobre el heterodímero (en rojo) y el de la adición del segundo CP sobre el complejo formado (espectro en negro superior) son exactamente iguales. Este resultado demuestra que el orden de la adición de los diferentes componentes de la mezcla no altera el resultado final, que en ambos casos conduce a la formación de la especie termodinámicamente más estable.

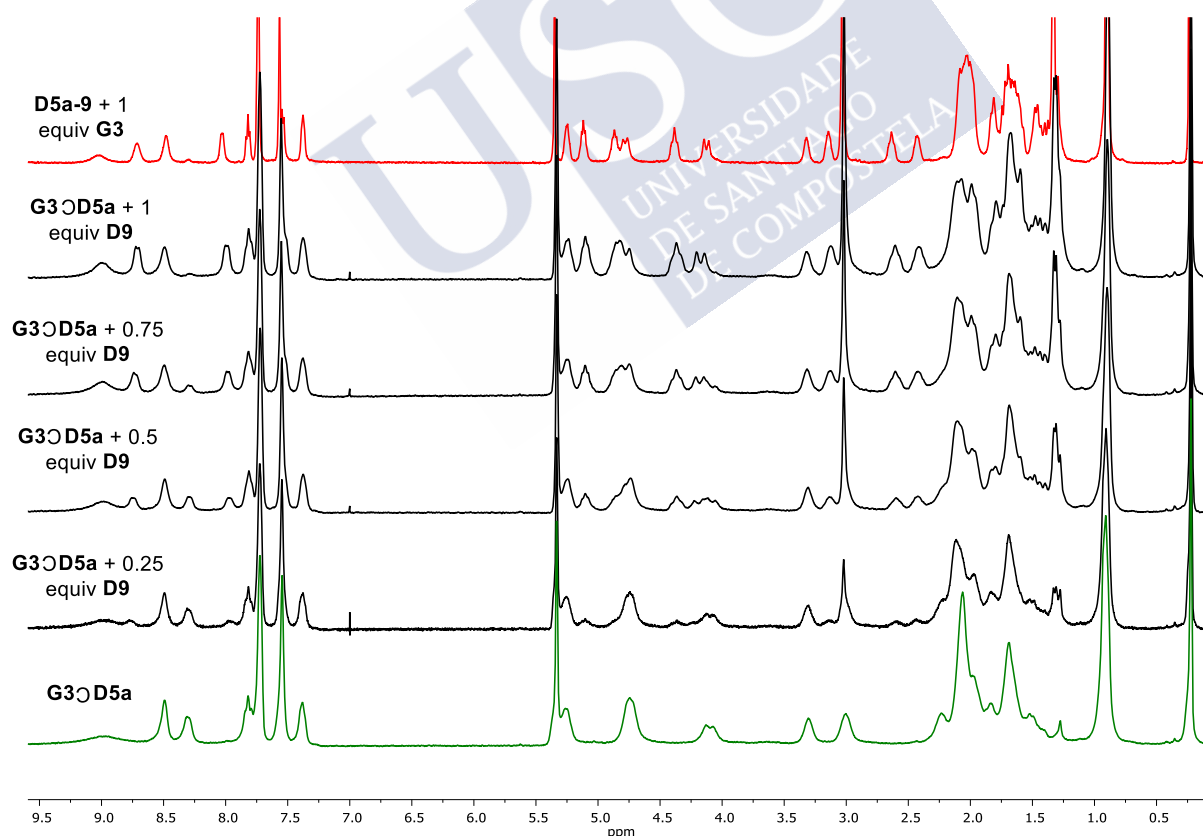


Figura 129. Espectros de RMN resultantes de la adición de **D9** sobre el complejo preformado de **G3**⊃**D5a** (5 mM, CD₂Cl₂) en negro. En la parte superior se muestra el espectro resultante de la adición

de un equivalente del ligando **G3** Sobre una mezcla del heterodímero **D5a-9** a la misma concentración (5 mM, CD_2Cl_2).

Para explorar otras alternativas, intentamos revertir nuevamente el heterodímero **D5a-9**, pero en este caso usando como *guest* la molécula **G4**, ligeramente más grande. De manera análoga, los espectros de RMN resultantes de la adición del ligando octanodiamonio **G4** sobre el heterodímero **D5a-9** se exponen a continuación en la Figura 130.



Figura 130. Espectros de ^1H RMN obtenidos de las adicciones sucesivas de **G4** (0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 equiv) sobre una disolución de **D5a-9** (verde, 5 mM en CD_2Cl_2). En la parte superior se muestra el espectro resultante de la adición de 1 equiv de **G3** sobre el mismo heterodímero. Las líneas punteadas resaltan las señales que mayor variación presentan entre ambos experimentos (protones amónicos y propargílico).

Tal como se puede observar, no se aprecian grandes diferencias entre ambos espectros. Quizás el punto final de la valoración con **G4** de lugar a señales ligeramente más anchas que el obtenido con su análogo **G3**. Existe una diferencia clara en el desplazamiento químico de los grupos amonio del ligando y el protón propargílico (indicadas con líneas discontinuas en la Figura 130) que, en todos los casos, sufre más variaciones en presencia de ligando ($\delta=4.78$ y

4.59 para **G3** y **G4**, respectivamente). A la vista de estos resultados se puede concluir que tampoco **G4** es capaz de revertir la formación del heterodímero.

Como último experimento con heterodímeros, se decidió estudiar la importancia de la orientación de los nitrógenos de las piridinas estudiando el comportamiento del CP con tres piridinas en la posición *meta*, **CP5b** (Figura 111). Como en el caso anterior la adición de 1 equiv del **CP8** dio lugar a la aparición de nuevas señales que se corresponden con la especie heterodimérica **D5b-8** (ver Figure 12, Parte Experimental). Sobre esta muestra se añadieron sucesivas cantidades del ligando **G3** hasta alcanzar la equivalencia. En este caso, tal como se muestra en la Figura 131, no se observa ningún cambio significativo en las señales correspondiente al heterodímero, al contrario que pasaba con **D5a-8**. Este resultado revela lo importante que es la orientación del átomo de nitrógeno a la hora de interaccionar con los diamonios. El hecho de que no se hayan desplazado las señales correspondientes al anillo de piridina ni a las señales propargílicas, sugiere que el **CP5b** no interacciona con **G3**. En vista de este resultado, descartamos realizar estudios adicionales de encapsulación análogos a los realizados con **CP5a**.

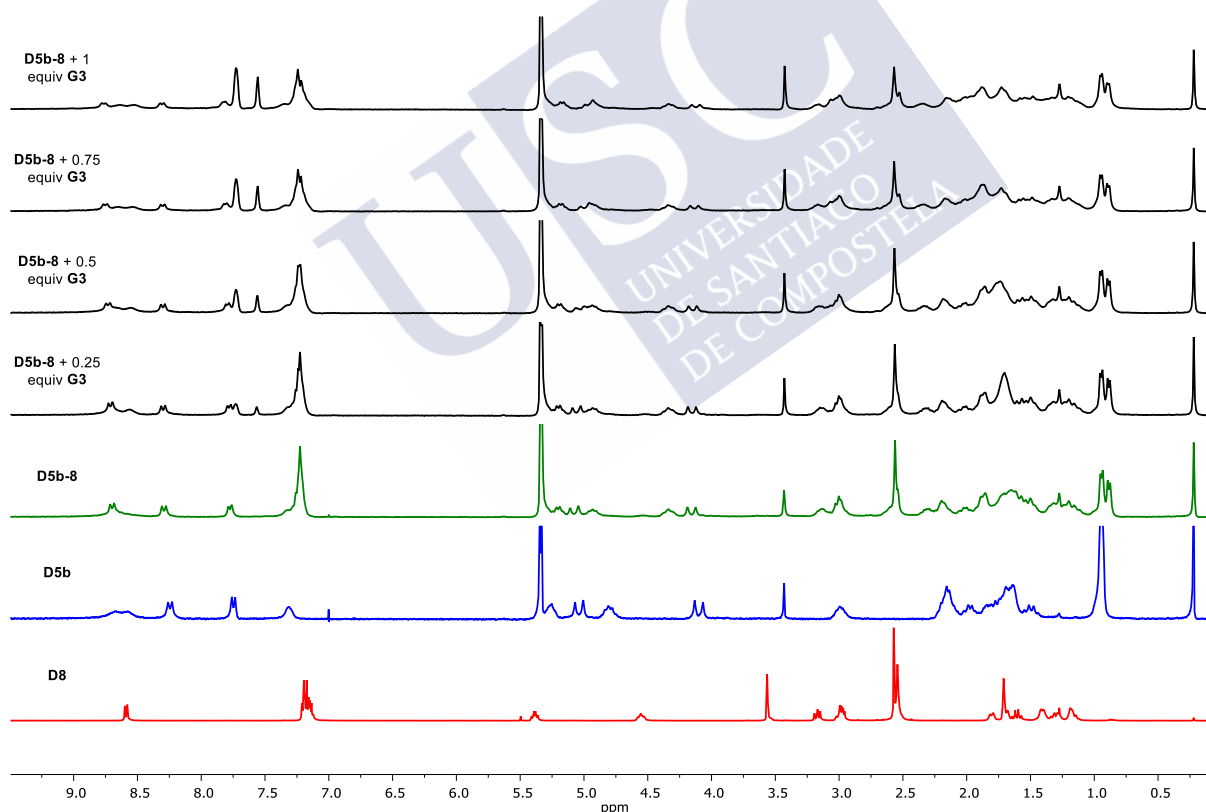


Figura 131. Espectros de ^1H RMN obtenidos de las adiciones sucesivas de **G3** (0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 equiv) sobre una disolución de **D5b-8** (verde, 5 mM en CD_2Cl_2).

Para cerrar esta sección con ligandos diamonio, nos preguntamos cuál sería el comportamiento de nuestro sistema al superar el punto de equimolaridad entre *guest* y *host*.

Además, para valorar la formación de agregados supramoleculares, pensamos que sería una buena opción comparar si existen diferencias entre alquilamonios y alquildiamonios por encima del punto de equivalencia. Para ello, en primer lugar, completamos el estudio de encapsulación entre **CP5a** y **G3** realizado previamente (Figura 132).

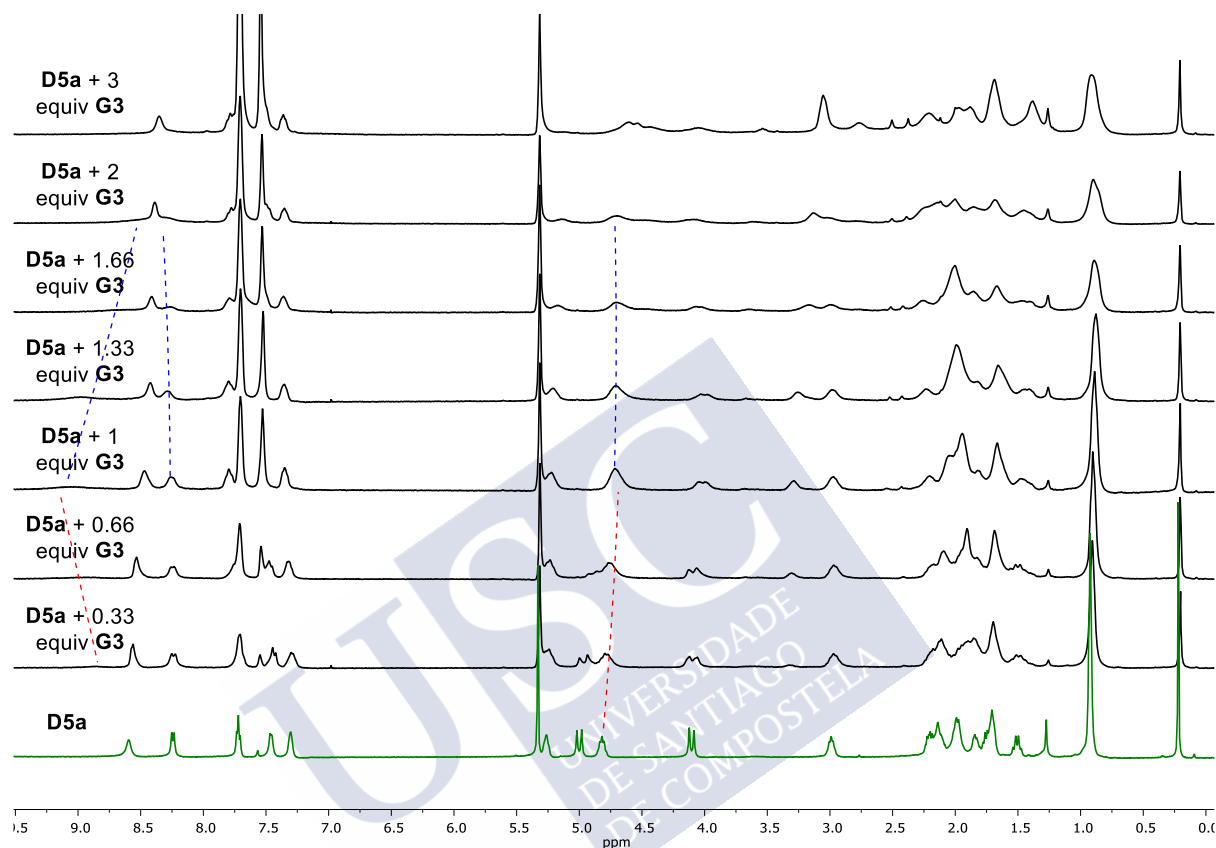


Figura 132. Valoración de RMN que muestra la interacción que se produce al añadir cantidades crecientes de **G3** sobre **D5a** en CD_2Cl_2 , en la que se aprecian comportamientos diferentes por debajo (líneas rojas) y por encima (líneas azules) del punto de equivalencia molar entre cápsula y ligando.

Tal como se puede apreciar en la valoración, a medida que se aumenta el número de equivalentes hasta igualar el número de grupos amonio con el de anillos de piridina (3 equivalentes de **G3** por dímero), se observa claramente una pérdida sustancial en la definición (ancheamiento) de las señales. Este comportamiento fue especialmente acusado en las últimas adiciones. Además, algunas señales (líneas punteadas en la Figura 132, NH_3 , H_5 o H_7) experimentan un comportamiento que podría definirse como “de ida y vuelta”, en el que su variación cambia de sentido dependiendo de si la valoración se encuentra antes o después del punto de 1 equiv (1 amonio para 3 anillos de piridina.). El comportamiento más extremo en este sentido tiene lugar con los protones del grupo amonio, que sufren un fuerte desapantallamiento hasta llegar a un equivalente para, después, apantallarse migrando hacia campo alto. En el punto final de esta migración se funden prácticamente con los protones del grupo NH de **D5a** (en torno a 8.4 ppm). A pesar de este ancheamiento en las señales, no parece producirse en ningún caso la aparición de otras especies en el espectro de protón, por lo que, de estarse formando

redes supramoleculares, el equilibrio entre las diferentes especies debe ser rápido en la escala de tiempos de RMN, lo que daría lugar a una señal promediada entre las diferentes especies en disolución.

En cuanto a la variante monodentada, preparamos la sal amónica de la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutanaminamina con el contraión voluminoso (**G7**) de manera análoga a la descrita previamente. Nuevamente, nos decantamos por la especie fluorada por motivos de conveniencia a la hora de estudiar la encapsulación mediante experimentos de correlación heteronuclear en RMN. Se puede observar una tendencia análoga con respecto a la valoración anterior, en donde también los núcleos de ^{19}F del ligando sufren ligeras variaciones en sus correspondientes desplazamientos químicos.

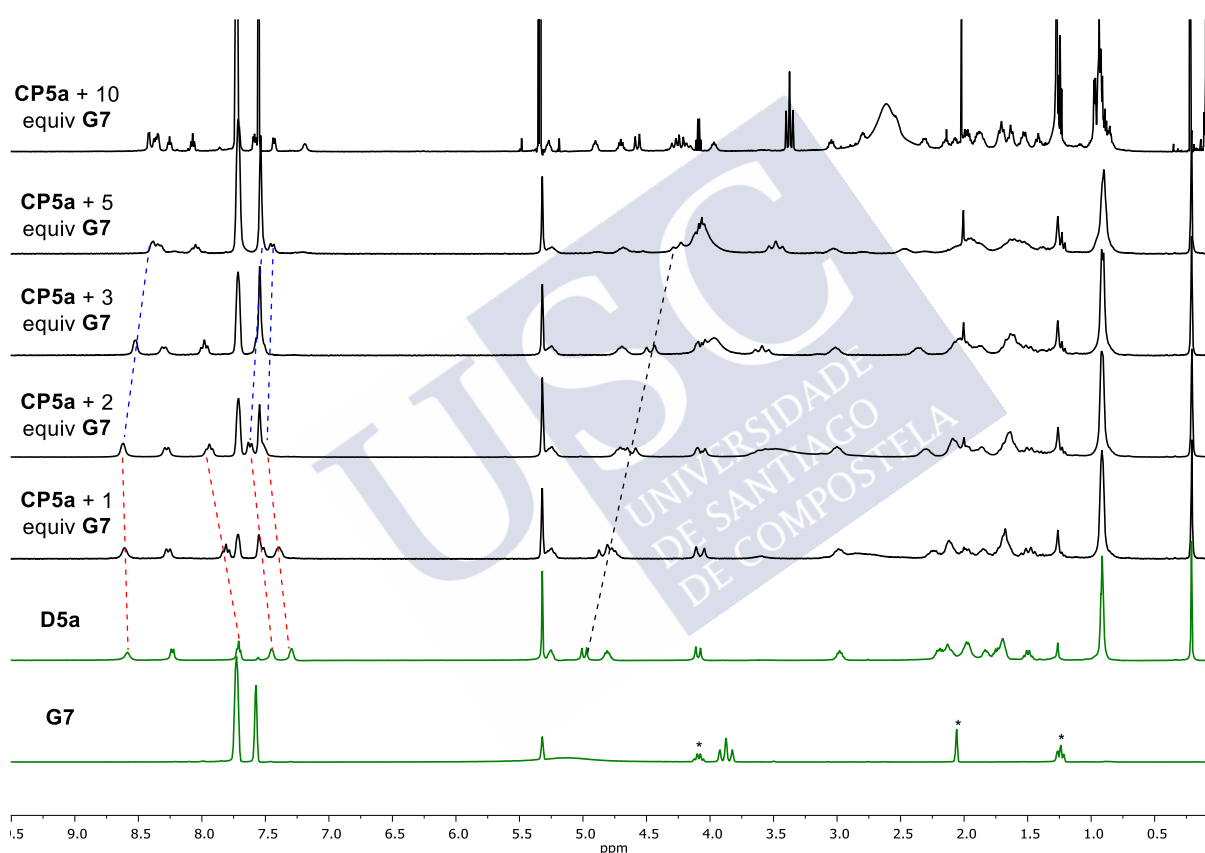


Figura 133. Valoración de **D5a** con **G7** hasta cantidades que exceden la cantidad de un grupo amonio con respecto a una unidad de piridina. Se aprecian comportamientos diferentes por debajo (líneas rojas) y por encima (líneas azules) del punto de equivalencia molar entre cápsula y ligandos.

En este caso, tal como esperábamos, el punto de inflexión se produce tras añadir 2 equiv de sal monovalente,⁴⁶⁵ lo cual tiene sentido puesto que coincide con el número total de grupos amonio por tapa añadidos (1 equiv de diamonio o 2 equiv de monoamonio). Sin embargo, no

⁴⁶⁵ Las señales marcadas con un asterisco se corresponden con AcOEt residual en la sal. El espectro de la parte superior se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Pedro Nieto en el CSIC de Sevilla. De ahí el incremento en la definición de las señales, puesto que se realizó en un espectrómetro más potente (600 MHz).

se produce un ancheamiento tan acusado como en el caso anterior. Además, el comportamiento de la muestra en los espectros ^1H de las adiciones de $>3\text{equiv}$ muestra sin lugar a duda la aparición de más de una especie, que se confirma claramente para el caso de 10 equiv (traza superior de la Figura 133), donde se ven dos juegos de señales para cada protón. Esta observación puede deberse a que en presencia de 1 equiv de amonio por tapa (2 equiv sal por dímico), la especie mayoritaria en el equilibrio es aquella en la que las tres piridinas cooperan para coordinar el mismo amonio. A medida que se sigue aumentando la cantidad de amonio, empieza a aparecer una especie adicional en la que menos de tres piridinas coordinan a la vez al grupo amonio. Estas dos especies deben de estar en un equilibrio de interconversión lento en la escala de RMN. Este resultado hace pensar que la constante de asociación entre las tapas de piridina y los amonios monodentados es relativamente baja y esta asociación es fácilmente reversible.

A la vista de todos los resultados obtenidos en este apartado, queda patente que la longitud y la naturaleza electrónica de los ligandos diamónicos son parámetros críticos a la hora de interactuar con la cápsula dimérica formada por el autoensamblaje de **CP5a**. En esta línea, parece que los ligandos tipo alquildiamonio **G2-4** interactúan más fuertemente con la cápsula **D5a** que los ligandos fluorados **G6-7**, pero no parece que todos ellos den lugar a los complejos de encapsulación esperados. De entre todas las especies analizadas, parece que únicamente **G3** y **G6**, con una longitud similar, dan lugar a complejos de inclusión (**G3** \supset **D5a** y **G6** \supset **D5a**), mientras que los más largos o cortos presentan indicios de formar agregados oligoméricos derivados de las interacciones, posiblemente, por la parte externa del dímico. Esta hipótesis se basa en los resultados de DOSY y en el ancheamiento de las señales a medida que se incrementa su concentración. Este comportamiento puede ser debido a la imposibilidad de establecer una interacción simultánea con ambas tapas de piridina si la distancia entre ambos grupos amonio no es la apropiada para la formación del complejo de inclusión. Desafortunadamente, en ningún caso fuimos capaces de revertir la formación de especies heterodiméricas utilizando esta estrategia.

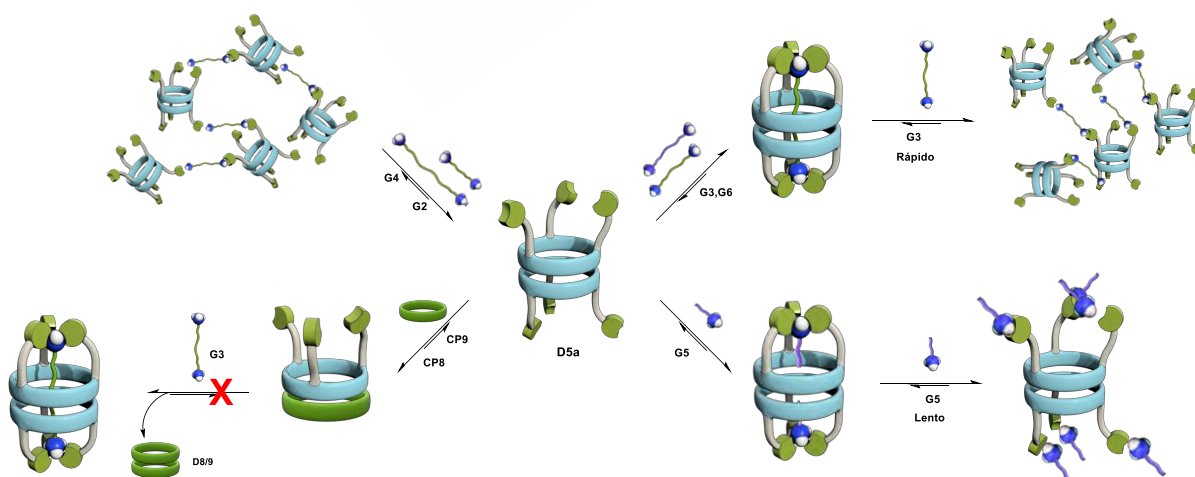


Figura 134. Modelo esquemático que ilustra las conclusiones más relevantes del estudio de encapsulación de ligandos amonio con **D5a**.

2. Encapsulación de ligandos heteroditópicos mediante ciclooctapéptidos

Tras evaluar la capacidad de α,γ -ciclohexapéptidos como cápsulas supramoleculares para ligandos con dos grupos funcionales idénticos, nos planteamos extender esta estrategia a receptores que pudiesen reconocer dos grupos funcionales distintos. Esta doble funcionalidad dotaría a nuestro sistema de una mayor versatilidad a la hora de encapsular moléculas de relevancia a nivel toxicológico o biológico donde la complejidad de los sustratos es mayor y rara vez está involucrado un único grupo funcional en los procesos de reconocimiento molecular. Además, creímos conveniente aumentar ligeramente el volumen interno de la cápsula o, lo que es lo mismo, incrementar el tamaño de la cavidad interna descrita por el dímero ciclopeptídico central. Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, la estrategia sintética para obtener estos CPs permite modular fácilmente el tamaño del anillo modificando el número de aminoácidos que lo componen. De esta manera, optamos por la utilización de octapéptidos cíclicos para esta segunda aproximación, cuyo diámetro interno presenta un incremento aproximado de 3 Å con respecto a los hexapéptidos cíclicos (7 vs. 10 Å).^{241b,c} Este cambio elimina la limitación en el uso de ligandos puramente lineales y alquílicos, permitiendo introducir, por ejemplo, anillos aromáticos en la estructura que determinen de una manera más precisa la geometría o la disposición espacial de los grupos directores de la encapsulación, como se verá a continuación.

2.1. Antecedentes

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se han utilizado con éxito unas cápsulas supramoleculares basadas en dímeros de α,γ -octapéptidos cíclicos cubiertos con metaloporfirinas (Figura 135) que definen la cavidad de la cápsula y dirigen la interacción con el *guest*, respectivamente.⁴⁶⁴ De esta manera, el centro metálico asociado a la porfirina determina qué tipo de ligandos se pueden incorporar a la cavidad mientras que no juega un papel protagonista a nivel estructural, como se ha visto en multitud de ejemplos de cápsulas y cajas de coordinación a lo largo de la Introducción. Una de las características más relevantes del diseño de la cápsula es la unión mediante enlaces covalentes dinámicos⁴⁶⁶ entre el dímero peptídico y las unidades de porfirina. Esto se lleva a cabo mediante la incorporación de dos γ -Acas en el CP funcionalizados con grupos hidrazida, que se condensan con dos aldehídos de una porfirina para dar lugar a las correspondientes hidrazonas, de tal manera que fijan dicho macrociclo en la boca de los dímeros. Además, la metalación de la porfirina mediante el ion metálico Zn^{2+} permite reconocer con éxito moléculas lineales y rígidas tipo bipyridina aromática.

^{241b,c} b) R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713. c) R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267-3269. R. J. Brea, M. J. Pérez-Alvite, M. Panciera, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 110-121.

⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 776-784.

⁴⁶⁶ P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711.

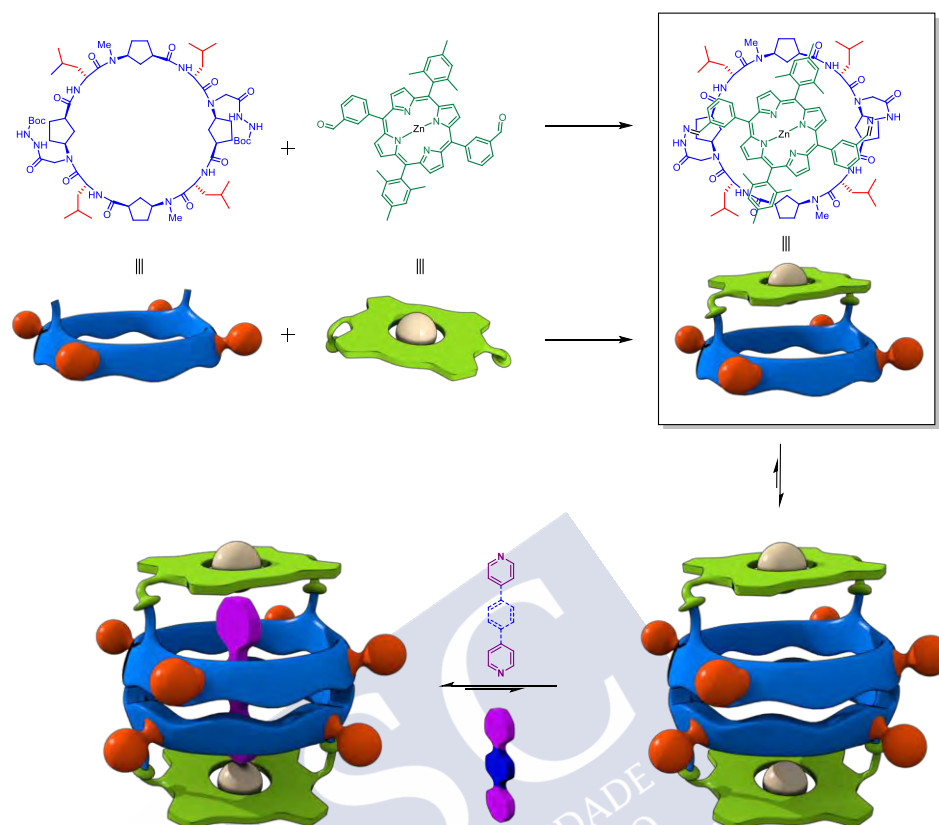


Figura 135. Trabajo previo realizado en el grupo de investigación utilizando cápsulas supramoleculares compuestas por híbridos de CP y metaloporfirinas para el encapsulado de bipyridinas.²⁰

De esta manera, se consiguió utilizar satisfactoriamente tres tipos de interacciones diferentes para, por un lado, mantener unidos los diferentes componentes de la cápsula (enlace covalente dinámico entre CP y porfirina y enlaces de hidrógeno para asociar ambas mitades peptídicas) y, por otro, favorecer la inclusión del ligando en ella (enlace de coordinación entre el Zn y el átomo de nitrógeno de la piridina). Tras sintetizar una pequeña biblioteca de ligandos bipyridínicos lineales de longitudes variables (entre 12 y 21 Å), se pudo estudiar su interacción con la cápsula mediante varias técnicas espectroscópicas. Entre ellas, la espectroscopía de UV-vis fue especialmente útil, ya que mediante el análisis de las variaciones en la banda Soret⁴⁶⁷ de la porfirina se pudo extraer la constante de asociación, K_a , o la molaridad efectiva (ME), entre otros. Todo ello evidenció que la distancia óptima entre nitrógenos de la bipyridina para formar el complejo *sandwich* se situaba en torno a los 16 Å. Esta distancia, obviamente, está relacionada con la distancia existente entre ambas tapas. Otras técnicas, como el RMN, también demostraron la encapsulación inequívoca de varios ligandos, tanto por la observación del típico apantallamiento de las señales de ligando cuando se sitúan debajo del cono de anisotropía de la porfirina, como por la aparición de picos de cruce entre huésped y anfitrión en experimentos

⁴⁶⁷ R. Giovannetti. *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins, Macro to Nano Spectroscopy*, ISBN: 978-953-51-0664-7, InTech, (2012).

no cuando se empleaban los ligandos más voluminosos (esqueleto basado en un núcleo de pireno).

2.2. Diseño de la cápsula heteroditópica

En base a los buenos resultados obtenidos con anterioridad en este primer proyecto, nos planteamos ir un paso más allá y tratar de extender esta aproximación para la encapsulación de ligandos ditópicos con grupos funcionales distintos en cada uno de sus extremos (heteroditópicos). Por ello, decidimos mantener intactas las características de los híbridos CP-porfirina usados con anterioridad, dada la disponibilidad de información clave como distancia interporfirínica o tamaño de la cavidad interna. Puesto que el reconocimiento supramolecular entre receptor y ligando viene dado por el enlace de coordinación entre el centro metálico de la porfirina y el grupo funcional del ligando, esta estrategia permite cambiar el metal de la porfirina por otros que tengan una diferente afinidad por el átomo coordinante (N, S, O, etc). Además, la metalación se puede realizar en las últimas etapas de la ruta sintética, lo que permite una diferenciación entre los intermedios sintéticos muy tardía y una mayor optimización en la síntesis.

A la hora de escoger los dos grupos funcionales que estarían presentes en los ligandos heteroditópicos pensamos en utilizar nuevamente las piridinas en uno de los extremos por nuestro amplio bagaje previo en su coordinación con metaloporfirinas de Zn (II).^{259,468} El segundo grupo funcional escogido fue el ácido carboxílico, ya que hay varios ejemplos en bibliografía de metaloporfirinas que coordinan este grupo funcional, como el Mg(II), el Co, Fe y Al(III), o el Sn y Ti(IV).⁴⁶⁹ De entre todas las opciones disponibles, nos decantamos por el uso de metaloporfirinas de Sn (IV), por ser una de las únicas puramente oxofílicas (gran afinidad por ligandos aniónicos de oxígeno), es decir, que presentan una baja afinidad por las bases de Lewis nitrogenadas. Además, estas metaloporfirinas presentan una gran estabilidad frente a la desmetalación y abren la puerta a estudiarlas mediante RMN de ¹¹⁹Sn.⁴⁷⁰ Estas porfirinas presentan normalmente dos ligandos axiales en disposición *trans*, aunque pensamos que esto no debería suponer un problema a la hora de llevar a cabo los estudios, ya que se pueden diseñar ligandos impedidos estéricamente que bloqueen la cara externa de coordinación de la cápsula (Figura 144).

En el pasado, se han creado sistemas heteroporfirínicos (comúnmente conocidos como *porphyrin arrays*, Figura 136) que combinan estos dos tipos de porfirinas de Zn y Sn mediante el uso de ligandos heterofuncionales que presentan fenóxidos o carboxilatos y piridinas, por lo que su capacidad de coexistir en el mismo sistema ya ha sido demostrada.⁴⁷¹ La combinación de grupos funcionales basados en grupos dadores de nitrógeno y carboxilato puede ser relevante

²⁵⁹ G. Aragay, B. Ventura, A. Guerra, I. Pintre, C. Chiorboli, R. García-Fandiño, L. Flamigni, J. R. Granja, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3427-3438.

⁴⁶⁸ L. P. Hernández-Eguía, R. J. Brea, L. Castedo, P. Ballester, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.

⁴⁶⁹ S. Olsson, C. Dahlstrand, A. Gogoll, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 11572-11585. H. Oumous, C. Lecomte, J. Protas, *Polyhedron* **1984**, *3*, 651-659. J. C. Hawley, N. Bampos, R. J. Abraham, J. K. M. Sanders, *Chem. Comm.* **1998**, *6*, 661-662.

⁴⁷⁰ D. P. Arnold, J. Blok, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 299-319.

⁴⁷¹ H.-J. Kim, N. Bampos, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8120-8121. J. E. Redman, N. Feeder, S. J. Teat, J. K. M. Sanders, *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 2486-2499.

a la hora de reconocer moléculas bioactivas como por ejemplo pequeños oligopéptidos con sus respectivos extremos N- y C- terminales desprotegidos.

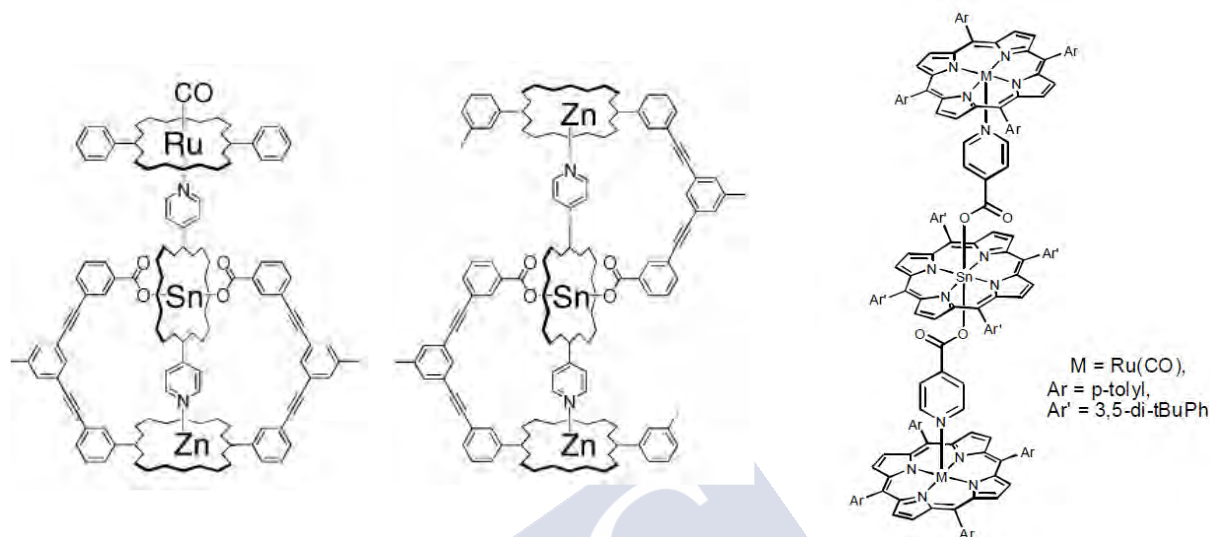


Figura 136. Ejemplos de sistemas multiporfirínicos desarrollados por el grupo de Sanders en los que se pone de manifiesto la posibilidad de combinar la coordinación de ligandos oxofílicos con porfirinas de Sn(IV) simultáneamente a la de ligandos de piridina con porfirinas de Zn o Ru(II). Los ligandos pueden ser unidades exógenas (ácido isonicotínico, derecha), o formar parte de los sustituyentes de los propios anillos de una de las porfirinas (izquierda y centro).⁴⁷¹

A nivel de diseño de la cápsula supramolecular, el núcleo de esta se basa en un dímero ciclopeptídico con un esqueleto análogo al ya utilizado en el primer capítulo de esta memoria. De esta manera, utilizaremos un ciclooctapéptido (**CP10**, Figura 138) que presente un eje de simetría C_2 , compuesto por una secuencia en la que se repita dos veces el tetrapéptido (D -Leu-^{Me} N - L - γ -Acp- D -Leu-^R N - L - γ -Acp), donde R representa al grupo mediante el cual se unirá el péptido a la metaloporfirina y que, en este caso, será una acetilhidrazida (de ahora en adelante representado como AcHyd). De nuevo se bloqueará la formación de enlaces de hidrógeno por la cara γ mediante la metilación de los demás nitrógenos peptídicos de los restantes γ -Acp, para evitar plegamientos no deseados (ver Capítulo I). En cuanto a las tapas, se utilizará el mismo esqueleto porfirínico en ambos casos, que se hará reaccionar con dos sales metálicas diferentes para obtener ambas tapas de la cápsula. La porfirina presenta una simetría C_2 análoga a la del péptido, incluyendo en dos posiciones meso no contiguas dos anillos de benzaldehído con sustitución en *meta*. Todo ello garantiza una complementariedad geométrica adecuada para el cerrado de la cápsula mediante la formación de dos enlaces hidrazona entre el péptido (hidrazida) y la tapa (aldehído). Tras formar la porfirina libre, se separarían dos porciones que se tratarían por separado con las sales de Zn o de Sn. Cada una de ellas se condensarían con el **CP10** para formar las dos hemicápsulas **CP10A** y **CP10B**. De esta manera, puesto que el esqueleto peptídico es el mismo, es de esperar que al mezclar cantidades equimolares de ambas moléculas, se formen tres dímeros diferentes mediante la formación de enlace de hidrógeno (**D10A**, **D10B** y **D10A-B**), los cuales estarían en equilibrio y, a priori, en una relación gobernada puramente por la estadística (1:1:2, respectivamente).

En cuanto a los ligandos, utilizaremos una estrategia basada en la formación de enlaces C-C mediante química de paladio para obtener una quimioteca de huéspedes relativamente rígidos y lineales que presenten en un extremo una piridina y en el otro un ácido benzoico, ambos con un patrón de sustitución en *para*. Entre ambos, se incluirá como espaciador otro anillo aromático unido a un número variable de unidades de etino o etano, lo que permitirá obtener en pocas etapas ligandos de longitudes variables para luego estudiar su interacción con la cápsula heterodimérica.

La idea fundamental detrás de este proyecto reside en que, al añadir un ligando que interaccione favorablemente con la cápsula, la naturaleza de este sea capaz de desplazar el equilibrio inicial entre las diferentes cápsulas vacías (Figura 137). De esta manera, la biblioteca dinámica de cápsulas se enriquece en el componente heterodimérico al interaccionar con un ligando heteroditópico o en sus componentes homodiméricos al encapsular un ligando homoditópico. En este último caso uno de los homodímeros complejaría al ligando mientras que el otro estaría vacío. Este fenómeno, conocido con el termino inglés *self-sorting*,⁴⁷² es ampliamente utilizado en el campo de la química combinatoria dinámica.⁴⁷³

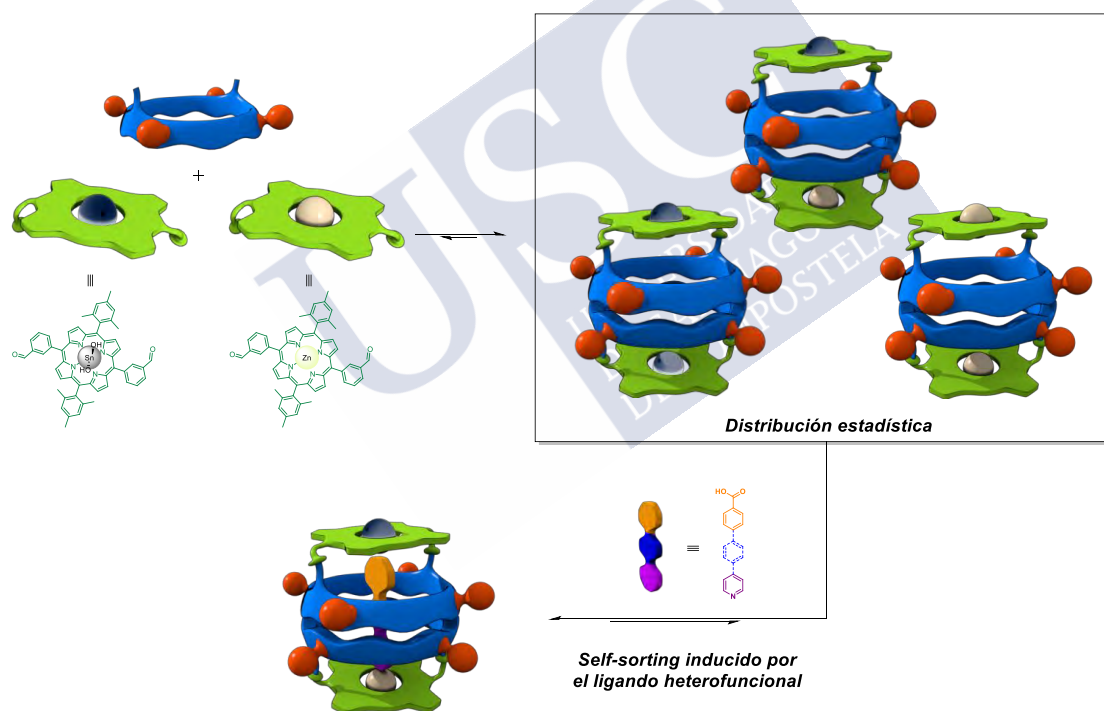


Figura 137. Estrategia seguida para la preparación de cápsulas heterodiméricas y su posterior *self-sorting* mediante la encapsulación de un ligando apropiado.

⁴⁷² M. M. Safont-Sempere, G. Fernández, F. Würthner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5784-5814.

⁴⁷³ P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711. P. Frei, R. Hevey, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 60-73.

2.3. Síntesis

Nuevamente, se llevó a cabo la síntesis peptídica en disolución utilizando una estrategia convergente (Figura 138). En cuanto a los grupos protectores para esta síntesis, la estrategia cambia con respecto al primer capítulo, ya que optamos por proteger de nuevo el extremo C-terminal como un éster metílico (desprotección en medio básico), mientras que el extremo N-terminal se equipará con un grupo protector sensible a la hidrogenación catalizada por paladio (carbamato de bencilo, Z). De esta forma, el grupo *tert*-butilo (sensible a medio ácido fuerte), se empleará en la protección de los grupos funcionales anclados sobre los Acp que permitan incorporar y manipular las hidracinas. Concretamente, se requiere una protección inicial del ácido como un éster *tert*-butilico que permitirá el acoplamiento ortogonal posterior de la hidracina protegida como un carbamato (Boc) una vez sintetizado el tetrapéptido lineal.

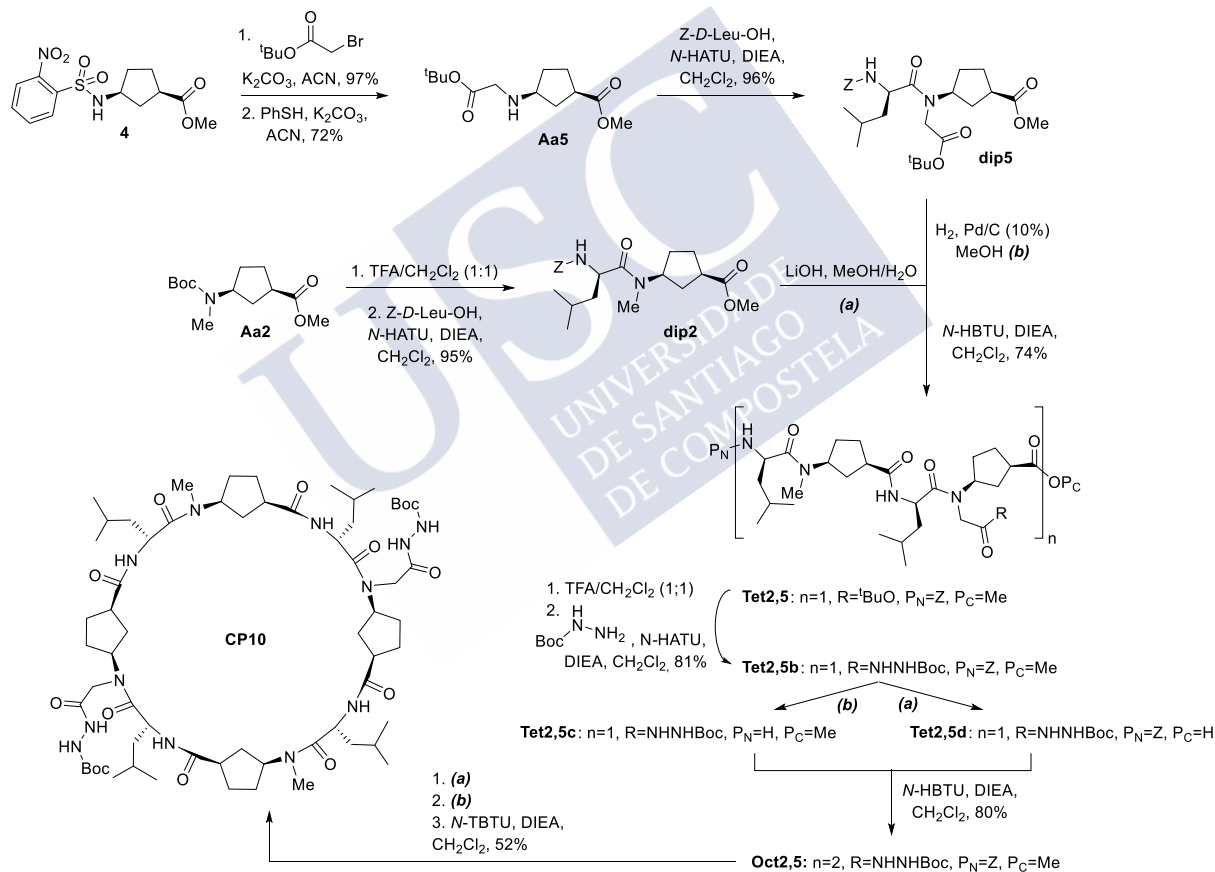


Figura 138. Esquema de la ruta sintética seguida para la obtención de **CP10**.

Inicialmente, se prepararon los γ -Aca *N*-funcionalizados basados en el esqueleto de Acp. La *N*-metilación se llevó a cabo por alquilación directa igual que en el primer capítulo, mientras que, la estrategia de Fukuyama³⁷⁴ se empleó para equipar el grupo acetilo. En esta línea, se trató una disolución de **Ns-L-Acp-OMe** (**4**) en ACN con un exceso de bromoacetato de *tert*-butilo y K_2CO_3 , para dar lugar al aminoácido diprotegido funcionalizado (**23**) con un grupo ácido sobre

el átomo de nitrógeno en un excelente rendimiento. Tras desproteger el grupo nosilo por tratamiento con tiofenol en medio básico, se obtuvo el *ActBu*N-L-Acp-OMe (**Aa5**). En primer lugar, se prepararon los dipéptidos **dip5** y **dip2** a partir de **Aa5** y **Aa2** (tras desprotección con TFA, en este último caso), por tratamiento con *Z-D*-Leu-OH, *N*-HATU y DIEA en CH₂Cl₂. A continuación, para la obtención del tetrapéptido, se desprotegió el extremo N-terminal del **dip5** mediante hidrogenólisis catalizada por Pd/C en MeOH y el extremo ácido del **dip2**, utilizando una disolución de LiOH en una mezcla MeOH/H₂O. Ambos fragmentos se acoplaron utilizando *N*-HBTU en medio básico para obtener el **tet2,5**, sobre el cual decidimos incorporar la hidracina para la posterior unión con la porfirina. Para ello, se trató el **tet2,5** con una disolución de TFA/CH₂Cl₂ y el ácido libre resultante se hizo reaccionar con carbazato de *tert*-butilo en presencia de *N*-HBTU y DIEA en CH₂Cl₂ para dar lugar a la acetohidrazida protegida **tet2,5b**. Este tetrapéptido se separó en dos fracciones para desproteger de forma separada los extremos N- y C-terminal de cada fracción, usando las condiciones ya descritas para la formación del **tet2,5**. Estas dos fracciones se acoplaron entre sí usando nuevamente *N*-HBTU y DIEA en CH₂Cl₂. De esta forma se obtuvo el octapéptido **oct2,5** en un buen rendimiento (80%). Tras desproteger secuencialmente los extremos ácido- y amino-terminal, se procedió a su ciclación en condiciones de alta dilución (2 mM) en CH₂Cl₂, utilizando *N*-TBTU como agente de acoplamiento y DIEA como base, lo que permitió obtener el **CP10** en un rendimiento del 52 %.

Para la síntesis del macrociclo porfirínico (Figura 139), optamos por la estrategia basada en una condensación de Macdonald⁴⁷⁴ (2+2) entre el derivado 2,2'-mesitildipirrometano (**24**), el cual se obtiene previamente mediante una condensación catalizada por ácido (TFA) entre mesitaldehído y pirrol, y el isoftalaldehído monoprotegido **25**. Este compuesto se había obtenido previamente mediante una secuencia de dos etapas. En primer lugar, se hizo reaccionar el 2,2-dimetilpropano-1,3-diol con el 3-bromo-benzaldehído en medio ácido, retirando el agua que se libera en la reacción mediante un Dean-Stark, para dar lugar al correspondiente acetal que, tras el intercambio metal-halógeno por tratamiento con *tert*-butillitio, se condensó con DMF para dar **25**. La condensación entre **24** y **25** se realizó en CH₂Cl₂ en presencia de TFA la cual, tras la oxidación con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-denzoquinona (DDQ), dio lugar a la porfirina **26** en un rendimiento en torno al 10%. Los grupos aldehído se desenmascararon mediante tratamiento con una mezcla bifásica de TFA/CH₂Cl₂/H₂O que condujo a la **Por1** en un 88% de rendimiento. Este intermedio se metaló por separado con Sn y con Zn, para dar lugar a las correspondientes metaloporfirinas (**Por1A/B**, respectivamente). El tratamiento de la porfirina **Por1** con carbazato de *tert*-butilo proporcionó **Por2**, la cual se metaló de manera análoga para obtener las metaloporfirinas **Por2A** y **Por2B**. Estas porfirinas se prepararon para emplearlas como modelos sencillos en los estudios de UV/Vis. En esta línea, la incorporación del núcleo de Sn se llevó a cabo mediante tratamiento con SnCl₂·2H₂O y Et₃N en una mezcla de CHCl₃/EtOH, seguido de una purificación mediante alúmina básica, que permite obtener el *trans*-dihidroxo complejo con rendimientos que oscilan entre el 25 y el 45%.⁴⁷⁵ Este rendimiento relativamente bajo se debe principalmente a la etapa de purificación, ya que se observa una cierta facilidad del centro de Sn (IV) de sustituir uno de los ligandos hidroxos por un grupo metoxi- o etoxi-. Para el Zn, se trató la porfirina libre con Zn(OAc)₂·2H₂O en una

⁴⁷⁴ B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2864-2872. C. H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11427-11440.

⁴⁷⁵ V. S. Shetti, M. Ravikanth, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2010**, *14*, 361-370.

mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, que permitió aislar las porfirinas deseadas en rendimientos en torno al 90%.

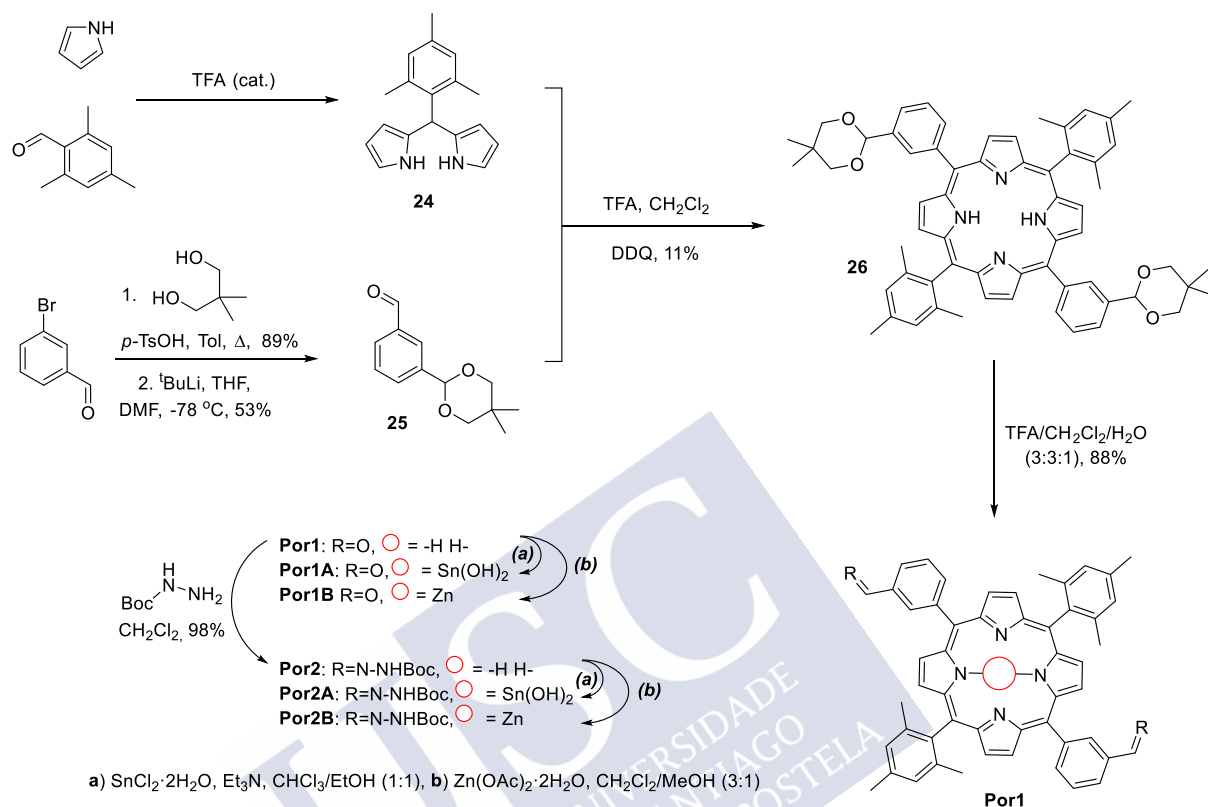


Figura 139. Ruta sintética hacia las tapas de las cápsulas (**Por1A/B**) y las porfirinas modelo para los estudios de UV-vis (**Por2A/B**).

Una vez aislados **CP10** y las porfirinas reactivas **Por1A/B**, solo restaba condensar las hidrazidas con los aldehídos para obtener las hemicápsulas deseadas. Con este objetivo, en primer lugar, se utilizó medio ácido fuerte (TFA) para transformar los dos grupos hidrazoformiato de *tert*-butilo de **CP10** en hidrazidas nucleófilas. Una vez desenmascarado el grupo hidrazida, la segunda etapa se realizó simplemente mezclando este sustrato con **Por1A** o **Por1B** en CH_2Cl_2 en condiciones de alta dilución (0.5 mM) tras haber eliminado concienzudamente el exceso de ácido del medio de reacción. El rendimiento de esta etapa es relativamente bajo en ambos casos, ya que se produce la formación de un subproducto que sospechamos que se trata de un agregado oligo/polimérico, a pesar de trabajar en condiciones de alta dilución.

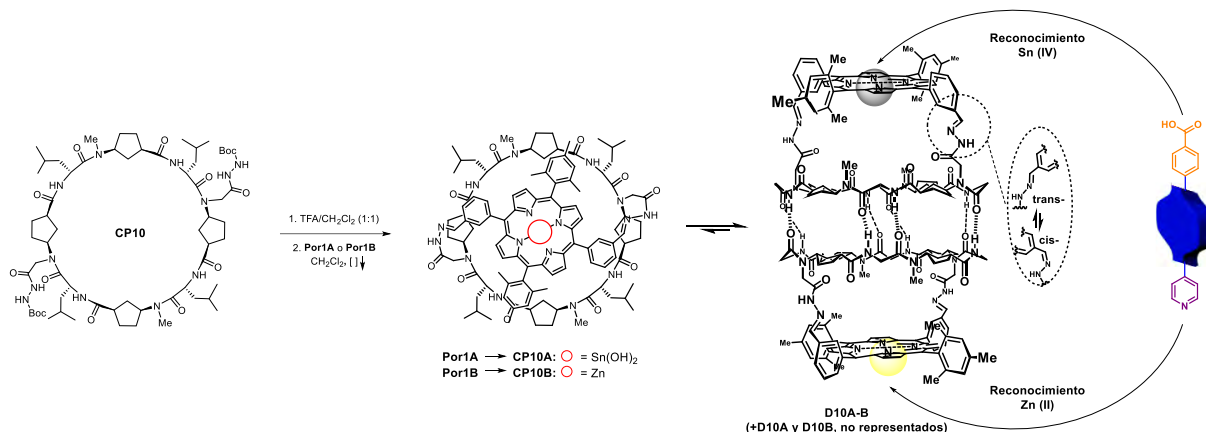


Figura 140. Modelo de formación de las diferentes hemicápsulas **CP10A** y **CP10B** a partir de **CP10** desprotegido y las metaloporfirinas **Por1A** y **Por1B**, respectivamente.

Como ya se ha comentado anteriormente, nos proponemos estudiar la encapsulación de una quimioteca de ligandos ditópicos que presenten en un extremo un ácido carboxílico y en el otro una piridina, para poder interaccionar simultáneamente con los núcleos de Sn y Zn de manera simultánea. Puesto que conocemos por trabajos previos un valor de distancia intermetálica aproximada (16 Å), se prepararán ligandos de longitudes en torno a dicho valor. Con el objetivo de reducir la flexibilidad conformacional de estos *guest*, optamos por la utilización de elementos rígidos para la preparación de estas estructuras, a saber, anillos aromáticos y espaciadores tipo acetileno disustituido. Para acceder a derivados con pequeñas variaciones en su tamaño, así como en su libertad conformacional, se puede recurrir a la reducción de estas unidades acetilénicas mediante su hidrogenación catalítica. En base a estas consideraciones, se sintetizaron los ligandos **L1-6** de manera sistemática (Figura 141) a partir de precursores comercialmente disponibles utilizando las reacciones de formación de enlaces C-C catalizadas por Pd, concretamente las reacciones de Sonogashira³⁷² y Suzuki.⁴⁷⁶

De esta forma el ligando de menor longitud **L1** se preparó empleando como sustancia de partida el ácido *p*-bromofenilborónico. El acoplamiento de Suzuki de dicho compuesto con el 4-yodobenzoato de metilo condujo al compuesto **14** en un 87% de rendimiento. Un nuevo acoplamiento de Suzuki de **14** con el ácido 4-pirimidilborónico seguido de hidrólisis en medio básico condujo al primero de los ligandos (**L1**). El compuesto **L2** se obtuvo de manera análoga a **L1** utilizando como sustancia de partida en este caso el 1-bromo-4-etinilbenceno, que se acopló mediante una reacción de Sonogashira al 4-yodobenzoato de metilo para dar lugar a **16** en un 69% de rendimiento. El acoplamiento de Suzuki de este con el ácido 4-pirimidilborónico y su hidrólisis en medio básico dio lugar a **L2** a partir del cual se preparó también el ligando **L3** mediante una hidrogenación catalítica con excelente rendimiento. Para la preparación de los últimos dos ligandos se recurrió a un procedimiento de Sonogashira asimétrico entre 1,4-dietinilbenceno y una mezcla de 4-yodobenzoato de metilo y 4-yodopiridina, que permitió aislar el intermedio **18** en un rendimiento moderado. Este intermedio se separó en dos porciones para, por un lado, llevar a cabo una reducción de los triples enlaces seguida de una hidrólisis del éster

⁴⁷⁶ N. Miyaara, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Letters*. **1979**, 20, 3437-3440.

³⁷² K Sonogashira, Y. Tohda, N. A. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, 50, 4467-4470.

metálico y, por otro, hidrolizar el benzoato de metilo sobre el sustrato diínico, lo que permitió obtener los ligandos **L5** y **L4**, respectivamente.

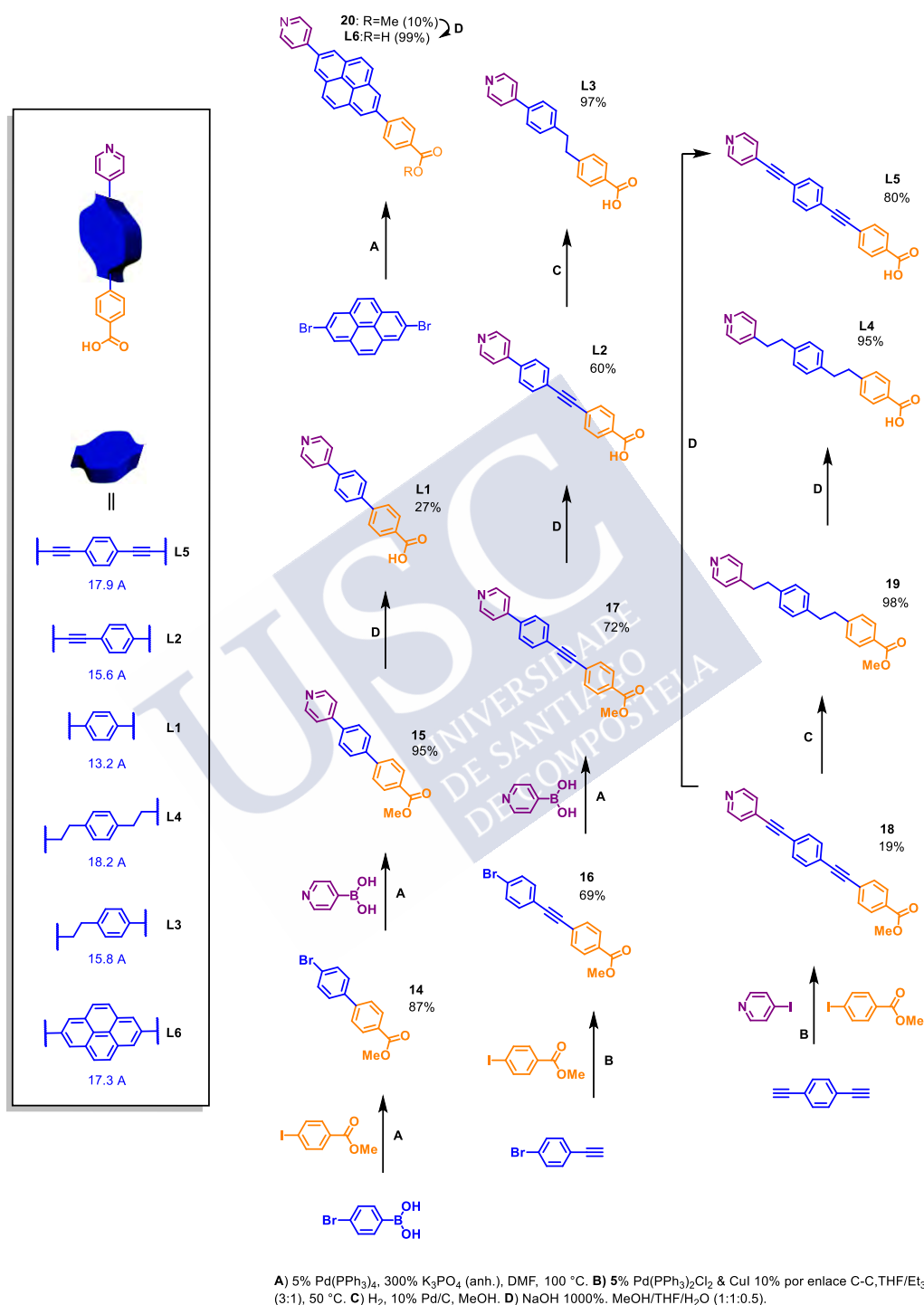


Figura 141. Diferentes rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los ligandos heterofuncionales. En la parte izquierda se muestran los tamaños estimados de los diferentes transportadores en función de la unidad espaciadora central (azul).

2.4. Caracterización de las cápsulas heterodiméricas y de los complejos *host-guest*

Dados los buenos resultados obtenidos previamente en el grupo mediante el estudio de este tipo de cápsulas por espectroscopía de UV-vis, decidimos comenzar la caracterización de nuestro sistema con esta técnica. En primer lugar, decidimos evaluar las propiedades espectroscópicas de los compuestos que contienen porfirinas de dihidroxi-Sn(IV), la modelo **Por2A** y **CP10A**, los cuales no habían sido descritos con anterioridad. En el espectro de UV-vis en CHCl_3 desacidificado (eluido a través de una fase estacionaria de Al_2O_3 básica) de **Por2A** y **CP10A** se pueden apreciar pequeñas diferencias en la λ_{max} de las bandas características, como la Soret o las bandas Q (Figura 142). Concretamente, en el caso de la hemicápsula, los máximos de dichos picos se sitúan a longitudes de onda entre 1 y 2 nm menores que en el caso de la porfirina modelo isoelectrónica. En todos los casos, la posición de λ_{max} , así como las relaciones de Abs entre las dos bandas Q están en consonancia con los valores reportados en la bibliografía científica para este tipo de complejos dihidroxi-Sn(IV)-porfirínicos con características similares a las de nuestros sistemas (porfirinas TPP⁴⁷⁷ o TpTP⁴⁷⁸, con cuatro sustituyentes arílicos en las posiciones *meso*), lo que aporta evidencias adicionales sobre la presencia de dos ligandos hidroxilo coordinando en *trans* al Sn.

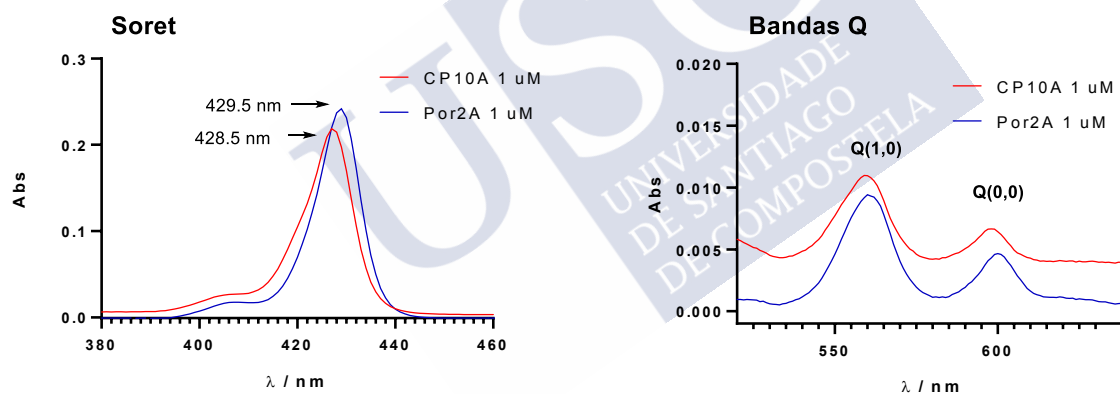


Figura 142. Comparación de los espectros de UV de **CP10A** (rojo) y **Por2A** (azul) entre las bandas características (Soret izquierda y Q derecha).

Con el objetivo de poder llevar a cabo las valoraciones con los diferentes ligandos de una manera precisa, decidimos evaluar el coeficiente de extinción (ϵ) del sistema **Por2A**. Puesto que esta molécula es isoelectrónica con la hemicápsula **CP10A**, no creímos necesario realizar el mismo experimento para este complejo y se decidió extrapolar el resultado obtenido con la porfirina modelo para ambos cromóforos. Este experimento se llevó a cabo nuevamente en CHCl_3 desacidificado, y se midió la intensidad de la Abs de la banda Soret en dos muestras independientes que se fueron diluyendo secuencialmente. Esto permite obtener rápidamente el

⁴⁷⁷ D. P. Arnold, *Polyhedron* **1986**, 5, 1957-1963.

⁴⁷⁸ D. P. Arnold, *Polyhedron* **1988**, 7, 2225-2227.

ϵ del complejo ya que Abs y concentración se relacionan linealmente mediante la ecuación de Beer-Lambert:⁴⁷⁹

$$Abs = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (9)$$

De esta forma, tal como se ilustra en la Figura 143, se puede obtener ϵ a partir de la pendiente de la recta. En este caso, tras realizar la media de los dos duplicados se obtuvo un valor de ϵ de $253080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, notablemente inferior al valor que presenta la porfirina modelo de Zn **Por2B**, cuyo valor de ϵ ($581000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) había sido descrito con anterioridad.⁴⁶⁴ Con este valor, es posible recalcular la concentración de una muestra desconocida de **Por2A/CP10A** evaluando simplemente la Abs a 428 nm.

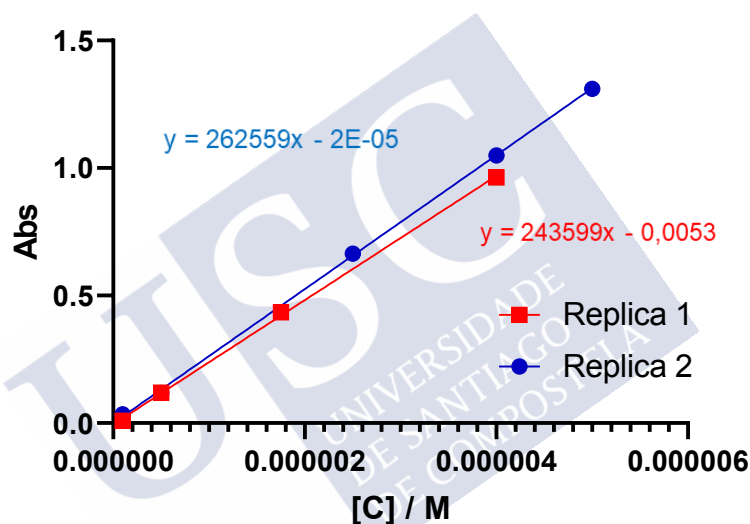


Figura 143. Ajuste realizado para la valoración del ϵ de **Por2A** a partir de la ley de Beer-Lambert.

Una vez obtenido este parámetro, decidimos comenzar las valoraciones con los ligandos. En estudios anteriores de **D10B** con ligandos bipyridínicos, se había determinado la K_a en base a los cambios en la intensidad de la banda Soret de la especie complejada, la cual presenta un desplazamiento batocrómico desde 421 nm (en la especie sin coordinar) hasta los 431 nm (en la especie que tiene coordinada una piridina).⁴⁶⁴ Se observaba además que a medida que iba aumentando la cantidad de ligando con respecto a la de cápsula, la intensidad de la banda original a 421 iba decreciendo a medida que aumentaba la nueva banda a 431. Para nuestro estudio, decidimos analizar la influencia que tenían ligandos tipo ácido carboxílico en el espectro de UV-visible de **CP10A** y **Por2A**, en primer lugar.

⁴⁷⁹ J. D. J. Ingle, S. R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey (1988).

⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 776-784.

Aunque no existen muchos estudios realizados sobre el mecanismo y la cinética del proceso,⁴⁸⁰ es conocido que las dihidroxi-porfirinas de Sn(IV) pueden sufrir una sustitución de los dos ligandos axiales hidroxilo en favor de carboxilatos al tratarlas con una disolución del ácido carboxílico en cuestión en disolventes apolares como CH₂Cl₂ o CHCl₃.⁴⁸¹ Este desplazamiento tiene lugar utilizando ligeros excesos de ácido y permite aislar el derivado dicarboxilato tras media hora de agitación y la posterior adición de un agente desecante para capturar el agua que se libera al medio. Además, la afinidad de los carboxilatos hacia el centro de Sn(IV) aumenta a medida que lo hace la acidez del mismo.⁴⁸⁰ De esta manera, es posible llevar a cabo una nueva sustitución sobre un sustrato con dos ligandos carboxilato axiales si se añade al medio un ácido más fuerte en exceso. Por el contrario, si la sustitución de las dihidroxi-porfirinas de Sn(IV) se lleva a cabo mediante el uso de un ácido muy débil (por ejemplo un alcóxido) o añadiendo menos de dos equivalentes de ácido, es posible observar en el medio de reacción la presencia de especies mixtas que mantienen uno de los dos ligandos hidróxido.⁴⁸⁰

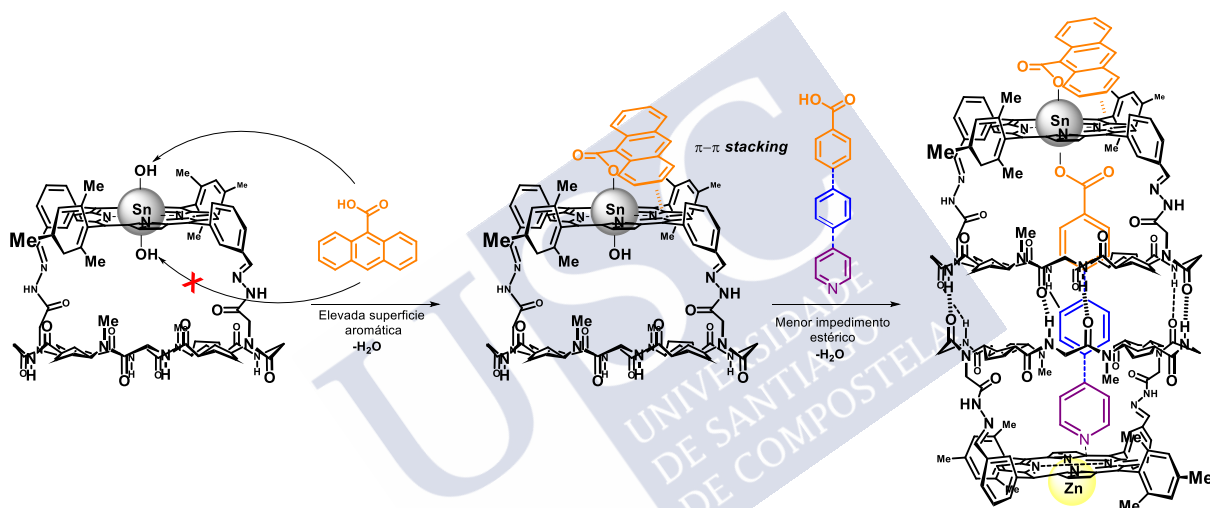


Figura 144. Estrategia de encapsulación de ligandos heteroditópicos con **D10A-B** mediante el bloqueo previo de la cara improductiva externa de **CP10A** con un ácido carboxílico voluminoso (**9-ant**).

Como primer *guest*, nos planteamos utilizar el ácido 9-antracenocarboxílico (**9-ant**), ya que en estudios previos se había mostrado que este ácido carboxílico aromático presenta una afinidad inusualmente alta para porfirinas tetrasustituídas con grupos aromáticos en las posiciones meso, seguramente a causa de interacciones de tipo π -stacking con el esqueleto porfirínico.⁴⁸⁰ Además, dada la elevada superficie de su pared aromática, puede ser especialmente útil para este proyecto en particular, puesto que, debido a la congestión estérica que existe en la cara de la porfina que está orientada hacia el esqueleto peptídico, es muy posible que la coordinación de este ligando solo pueda tener lugar por la cara externa de la cápsula (Figura 144). De esta forma, si se usa 1 equiv de **9-ant** en presencia de otro ligando derivado del ácido benzoico, es probable que, dada la gran afinidad del primero, este sea el que interaccione más favorablemente y, necesariamente, lo hará por la parte externa, bloqueando

⁴⁸⁰ J. C. Hawley, N. Bampos, R. J. Abraham, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1998**, 661-662.

⁴⁸¹ D. P. Arnold, *J. Chem. Ed.* **1988**, 65, 1111-1112.

así la posición “improductiva” durante el proceso de formación de complejos *host-guest* heterofuncionales de encapsulación.

En este sentido se realizaron mezclas de 0.5 hasta 100 equiv de ácido 9-antracenocarboxílico (por centro metálico) con la hemicápsula **CP10A** y el modelo **Por2A**, ambas disueltas en CHCl_3 a una concentración de 500 nM (en el caso de **CP10A**, la concentración de la especie **D10A**, muy mayoritaria en esas condiciones, sería aproximadamente la mitad). La preparación de las muestras para los estudios de UV-vis se realizaron a partir de una misma disolución stock de **CP10A** o **Por2A**, de tal manera que la concentración de cromóforo fuese igual en todos los experimentos de la serie. Sobre esta se añadieron diferentes alícuotas de disoluciones a concentraciones variables de los ligandos en DMSO, de tal manera que dicha adición nunca supusiese más de un 4% de dilución en la muestra de cromóforo. Tras agitar estas mezclas durante más de 12 horas para garantizar la formación del complejo se midieron los espectros de UV-vis de las diferentes muestras (Figura 145). En el caso de **Por2A**, se pudo observar una ligera disminución de la absorbancia a medida que se aumentaba el número de equivalentes, sin verse afectada la λ_{max} . Para **CP10A**, la observación fue diferente, ya que se produce un aumento de la Abs inmediatamente después de la primera adición de ligando, que parece que no sufre modificaciones adicionales en presencia de más ácido carboxílico. λ_{max} sufre un desplazamiento hipsocrómico de 1 nm invariablemente al número de equivalentes añadidos.

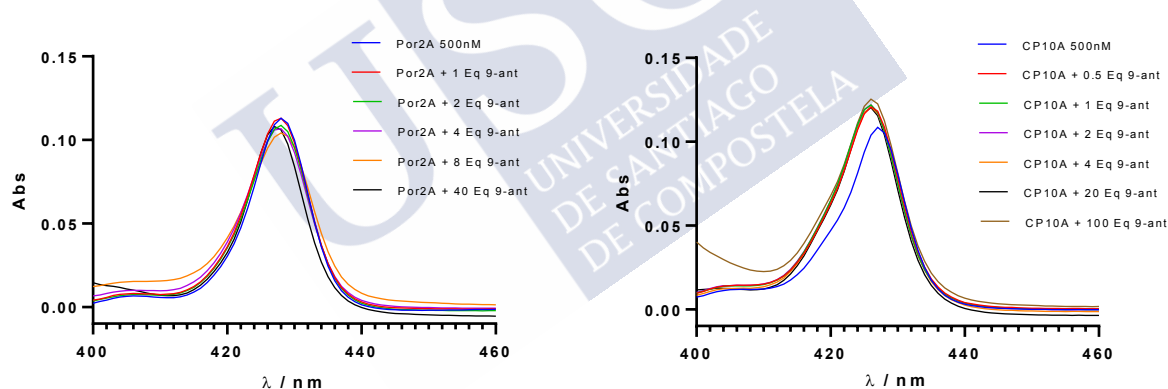


Figura 145. Valoración de **Por2A** (izquierda) y **CP10A** (derecha) con cantidades crecientes del ácido 9-antracenocarboxílico (**9-ant**).

En vista de este resultado, decidimos movernos hacia un ligando ditópico, pero todavía homofuncional, con el fin de evaluar con un mayor detalle el comportamiento de los sistemas sándwich con estannoporfirinas. Para ello, decidimos preparar el compuesto **L7** (Figura 146) que, con una longitud estimada de 16 Å, puede ser un buen candidato para ver si existen diferencias sustanciales entre la cápsula y la porfirina libre. Para ello, partimos del 4-yodobenzoato de metilo, el cual se hizo reaccionar mediante una reacción de Sonogashira con el trimetilsililacetileno para dar el intermedio **21**. El triple enlace se desprotegió mediante tratamiento de KOH para posteriormente realizar un autoacoplamiento de tipo Glasser-Hay

catalizado por Cu(II) en presencia de TMEDA y aire.⁴⁸² El compuesto **22** obtenido tras la última etapa se hidrolizó para dar lugar al ligando dicarboxílico deseado **L7**.

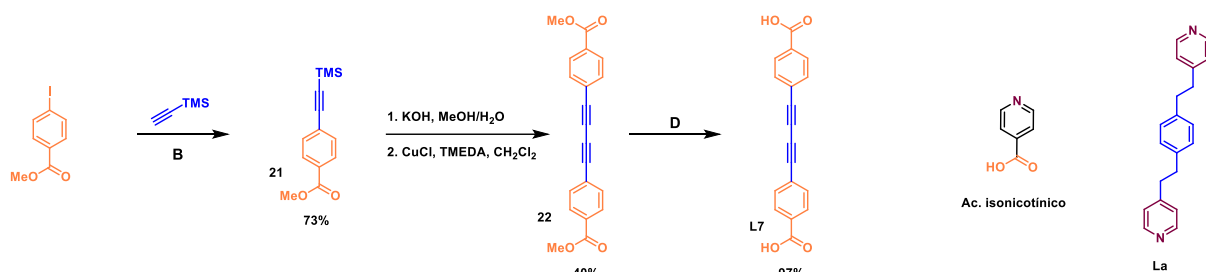


Figura 146. Izquierda: Estrategia sintética empleada en la preparación de **L7**. Derecha: otros ligandos empleados en las valoraciones con la mezcla de hemicápsulas. Las condiciones de reacción indicadas como *B* y *D* son análogas a las descritas en la Figura 141.

Si se realiza una valoración similar a la llevada a cabo previamente, se observa un comportamiento muy parecido para **Por2A** y **CP10A** (Figura 147), en la que la Abs aumenta a medida que se le van añadiendo equivalentes de **L7**. En el caso de **CP10A**, además se observa un desplazamiento de λ_{max} similar al del caso de **9-ant**, que para **Por2A** solo es apreciable con un gran número de equivalentes.

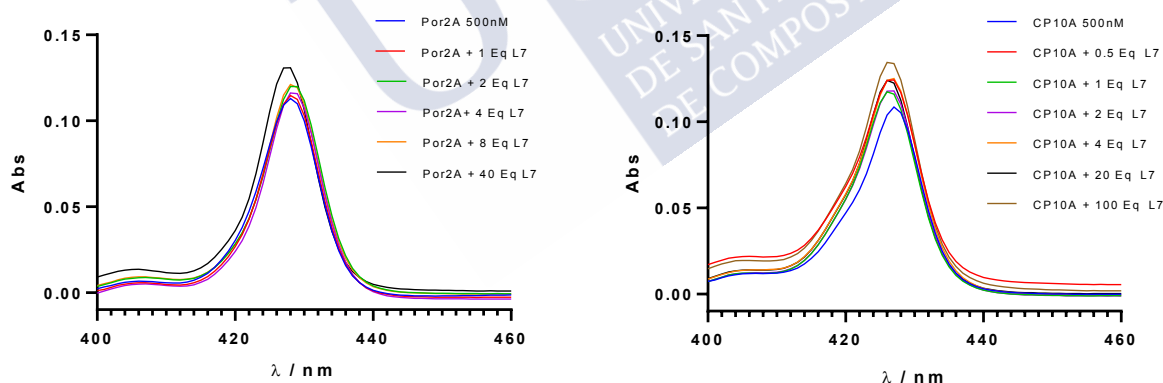


Figura 147. Valoración de **Por2A** y **CP10A** con cantidades crecientes del ligando homoditópico **L7**.

Las ligeras diferencias que se aprecian entre los diferentes ligandos para el caso de **CP10A** puede indicar la relevancia del impedimento estérico a la hora de sustituir ambos hidroxilos ya que, a pesar de añadir exceso de **9-ant**, no se produce evolución alguna en el aspecto de la banda Soret. Sin embargo, para el ligando **L7** más estrecho, se produce una evolución paulatina con el aumento de los equivalentes, sugiriendo una sustitución completa.

⁴⁸² A. S. Hay, *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, 27, 3320-3321.

Estos mínimos cambios que se producen en la banda Soret de las porfirinas de Sn, tanto en términos de Abs como de λ_{max} , en base a su coordinación a ácidos carboxílicos o a los grupos OH iniciales, puede ser debido al menor carácter dador de los oxoaniones comparado con el de las aminas en el caso de las porfirinas de Zn. En vista de este resultado, se antoja complicado que vaya a ser posible llevar a cabo un estudio estadístico similar al realizado en el grupo en el pasado con **D10B** y bipyridinas.⁴⁶⁴

Tras analizar el comportamiento de los sistemas homometálicos de la **Por2A** y el **D10A** con ligandos carboxilato mono y ditópicos, decidimos abordar el estudio de sistemas heterometálicos como **D10A-B** y **Por2A** y **Por2B**. En nuestro caso, si se realiza una comparativa entre los espectros de ambos componentes por separado, con una mezcla equimolar de ambos, se puede observar que el espectro de la mezcla se corresponde (prácticamente) con la suma de ambos por separado (obtenida aritméticamente y que se representa en la Figura 148 mediante una línea discontinua). El hecho de que en la muestra de la mezcla de ambos CP no se observe un resultado diferente al de la suma aritmética de ambos espectros por separado, sugiere que no se está produciendo ningún tipo de afectación o comunicación entre ambos cromóforos. En trabajos previos del grupo donde se habían utilizado las cadenas laterales de CPs para aproximar dos anillos de porfirina se había observado⁴⁸³ que se producía una migración de la banda Soret hacia el rojo debido a un acoplamiento excitónico entre ambos cromóforos, que ya era conocido en complejos tipo sándwich de porfirinas de Zn con ligandos *bis*-nitrogenados cortos como el DABCO.^{259,468} No obstante, para el caso de la cápsula **D10B** estudiada previamente, este acoplamiento no se observó ni en la cápsula vacía ni tras la coordinación, por lo que era de esperar que tampoco se produjese una diferenciación en la especie heterodimérica **D10A-B**.

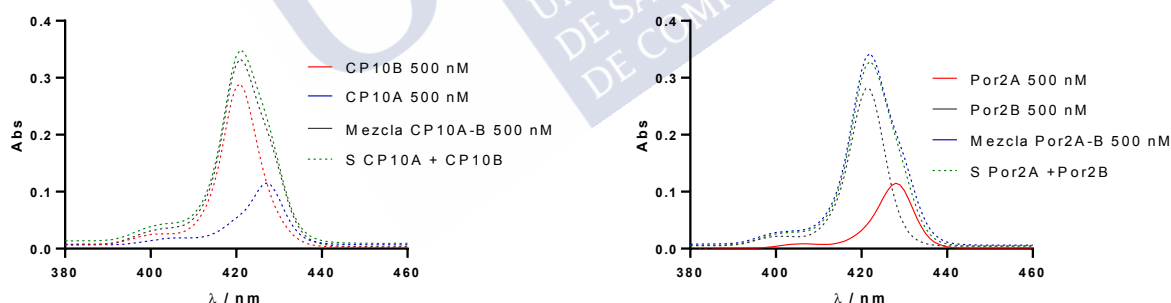


Figura 148. Comparativa de los sistemas homometálicos y heterometálicos por separado. La traza discontinua indicada como *S* refleja la suma aritmética de las especies por separado.

⁴⁸³ L. P. Hernández-Eguía, R. J. Brea, L. Castedo, P. Ballester, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.
G. Aragay, B. Ventura, A. Guerra, I. Pintre, C. Chiorboli, R. García-Fandiño, L. Flamigni, J. R. Granja, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3427-3438.

²⁵⁹ G. Aragay, B. Ventura, A. Guerra, I. Pintre, C. Chiorboli, R. García-Fandiño, L. Flamigni, J. R. Granja, P. Ballester, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3427-3438.

⁴⁶⁸ L. P. Hernández-Eguía, R. J. Brea, L. Castedo, P. Ballester, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1220-1229.

⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 776-784.

A continuación, llevamos a cabo el análisis de la encapsulación de los diferentes ligandos heterofuncionales **L1-5** sintetizados previamente. Con el fin de desarrollar un protocolo de medida eficiente que pudiese arrojar el máximo de información sobre el sistema, en primer lugar, estudiamos el comportamiento de diferentes variables en la medida de los complejos *host-guest* utilizando el ligando **L3**, ya que a priori es la molécula con un tamaño más ajustado al de la cápsula si nos atenemos a nuestro trabajo previo.⁴⁶⁴ En esta línea, comenzamos analizando la influencia que tiene en las valoraciones de **CP10A-B** con **L3** la presencia de **9-ant**, la molécula que pretendemos que actúe bloqueando la cara externa de la tapa porfirínica de Sn. En la Figura 149 se muestran los espectros de UV-vis resultantes de dicho estudio, en el que además se observó el efecto que tiene en las medidas el modo de incubación (simultáneo o secuencial) de ambos ligandos carboxílicos.

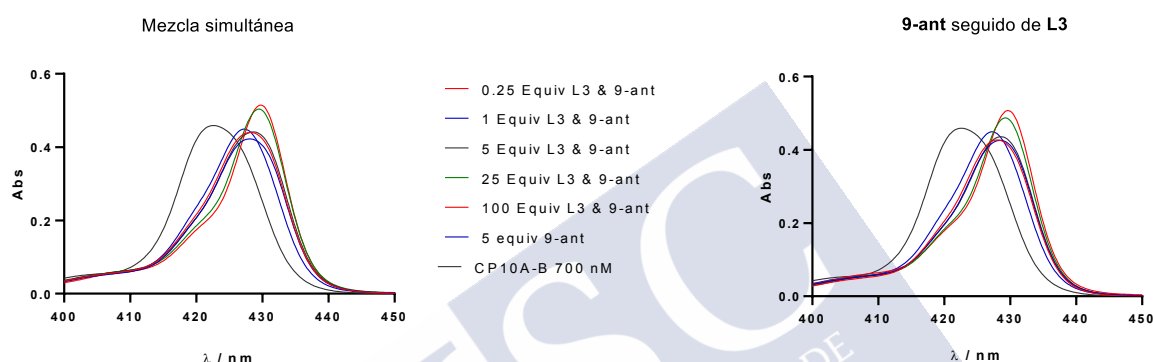


Figura 149. Espectros de UV-vis obtenidos del estudio del efecto que tiene el orden de complejación de los ligandos **L3** y **9-ant** con **CP10A-B**. Izquierda: complejación simultánea de todos los componentes. Derecha: complejación de **CP10A-B** con **9-ant**, seguida de complejación con **L3**.

Tras llevar a cabo a cabo las valoraciones en presencia del mismo número de equivalentes de **9-ant** y de **L3**, ambos en cantidades variables con respecto a la mezcla de las cápsulas (500 nM de cada uno de los CPs), se pudo observar que el resultado del experimento era independiente del orden en el que se adicionaban los distintos componentes. De esta manera, los espectros obtenidos sugieren que no es necesaria una preincubación de la mezcla de cápsulas con **9-ant** durante varias horas antes de añadir el ligando heterofuncional **L3** (Figura 149, derecha), ya que el resultado obtenido era comparable (mínimas variaciones, dentro del error experimental) al obtenido si la adición de ambos componentes era simultánea (Figura 149, izquierda). En este caso, desde la primera adición se produce una migración acusada de λ_{max} desde 422.8 hasta 428 nm, la cual aumenta ligeramente (429 nm), al igual que la Abs, al añadir un gran exceso (>25 equiv) de ligandos. Por tanto, para reducir los tiempos experimentales decidimos realizar la complejación simultáneamente, en vista del nulo efecto que esta variable tiene en el resultado final.

Dada la anteriormente comentada afinidad de **9-ant** por las porfirinas de estaño, pensamos que quizás no fuese necesario añadir el mismo número de equivalentes de **9-ant** que de ligando heteroditópico para observar el bloqueo externo deseado. Para evaluar esta hipótesis, realizamos una valoración similar a la representada en la izquierda de la Figura 149, pero manteniendo un número constante de equivalentes de **9-ant** a lo largo de todo el experimento

(5 equivalentes. Figura 150, izquierda) y en otro añadiendo una cantidad igual de **9-ant** y de **L3** (Figura 150, derecha).



Figura 150. Espectros de UV-vis en los que se aborda el estudio del efecto del número de equivalentes de **9-ant** en las valoraciones de **L3** con la mezcla de los péptidos **CP10A** y **CP10B**.

En este caso, a la vista de los resultados parece haber una variación importante entre ambas situaciones en los puntos de la valoración anteriores a 25 equiv de **L3**. En el caso de mantener constante la cantidad de **9-ant** (Figura 150, izquierda), los resultados parecen agruparse en dos clústeres en donde el punto de inflexión está entre 5 y 25 equiv de **L3**, mientras que en el experimento con cantidades iguales de **L3** y **9-ant** (Figura 150, derecha) la mayoría de las medidas se agrupan en torno al mismo valor, coincidente con la situación por encima 25 equiv del primer experimento. Este resultado nos resultó bastante sorprendente, ya que sería de esperar que las mayores diferencias entre ambos experimentos se produjesen en aquellas medidas que presentan más diferencias entre sí en la presencia de grupos carboxilato (por ejemplo, para 100 equiv de **L3**, en el experimento de la izquierda existen 105 equiv de ácido mientras que en el de la derecha están presentes 200 equiv). Además, debe tenerse en cuenta que el experimento donde ambos carboxilatos están presentes en la misma cantidad es idéntico al presentado en la parte izquierda de la Figura 149, y, como puede comprobarse, el resultado difiere considerablemente. Desconocemos la causa de esta variabilidad en las medidas, aunque quizás se deba a una progresiva hidratación de las disoluciones stock de las cápsulas o de los ligandos (muchos de los cuales se almacenan como disoluciones stock en DMSO) con el paso del tiempo. En cualquier caso, este es un fenómeno que hemos observado en otros experimentos, donde la reproducibilidad de los resultados no es tan alta como sería deseable, como se verá más adelante en esta sección.

Otra interrogante es si existe diferencia entre la realización de las valoraciones en presencia de varios equivalentes de **9-ant** frente a los experimentos realizados con ligandos heteroditópicos puros. En otras palabras, se debe determinar si estamos viendo el proceso de bloqueo de la cara externa por **9-ant** mediante UV-vis o no. Tras realizar el experimento con **L3** puro (Figura 151, izquierda) y comparar los resultados con la mezcla de **L3** y **9-ant** (Figura 151, derecha) observamos que, a pesar de que alguno de los puntos de la valoración se separa de esta, existe una tendencia que implica que al aumentar el número de equivalentes de **L3**, aumentan progresivamente tanto la Abs como la λ_{\max} . La diferencia reside en la magnitud de ese aumento, ya que en presencia de **9-ant**, λ_{\max} alcanza los 429.5 nm (frente a los 428.5 de **L3**

puro), mientras que en el terreno de Abs, el aumento con **L3** puro es mayor que en la mezcla de **L3** con **9-ant**. Además, en presencia de **9-ant** parece que los resultados se agrupan en dos clústeres claros (cantidades de **L3** por encima/debajo de 25 equiv), mientras que en su ausencia da la sensación de que el sistema presenta una mayor respuesta a los estímulos intermedios, con cambios más progresivos a lo largo de la valoración.

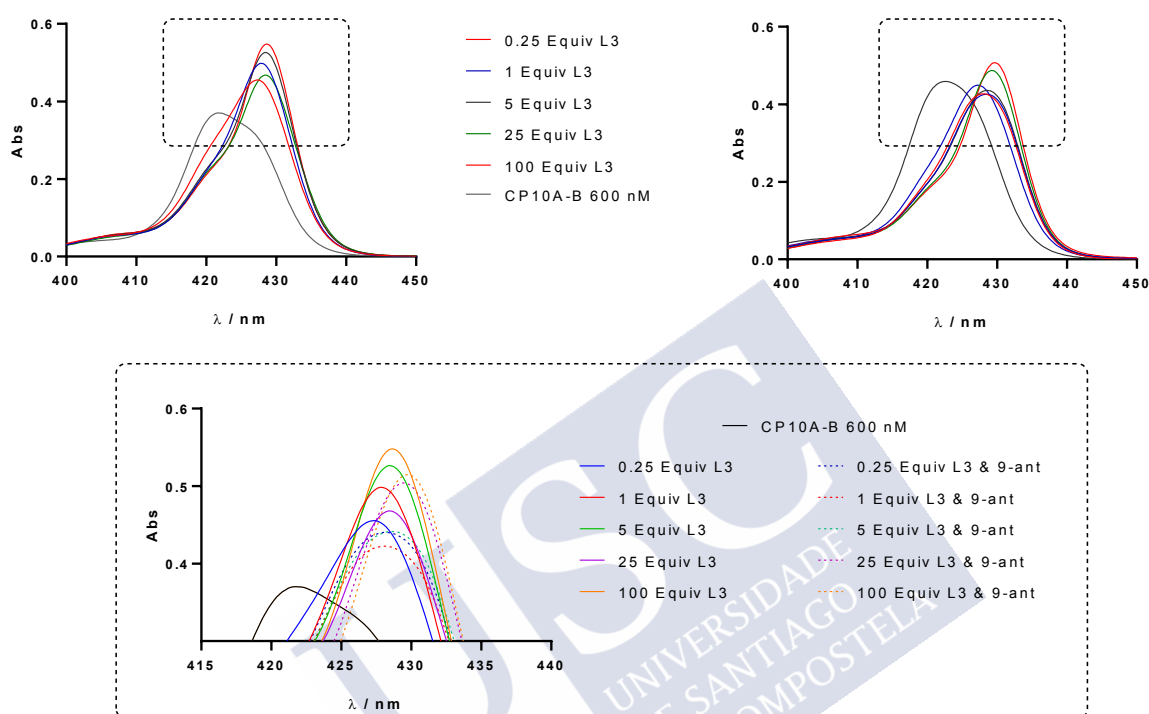
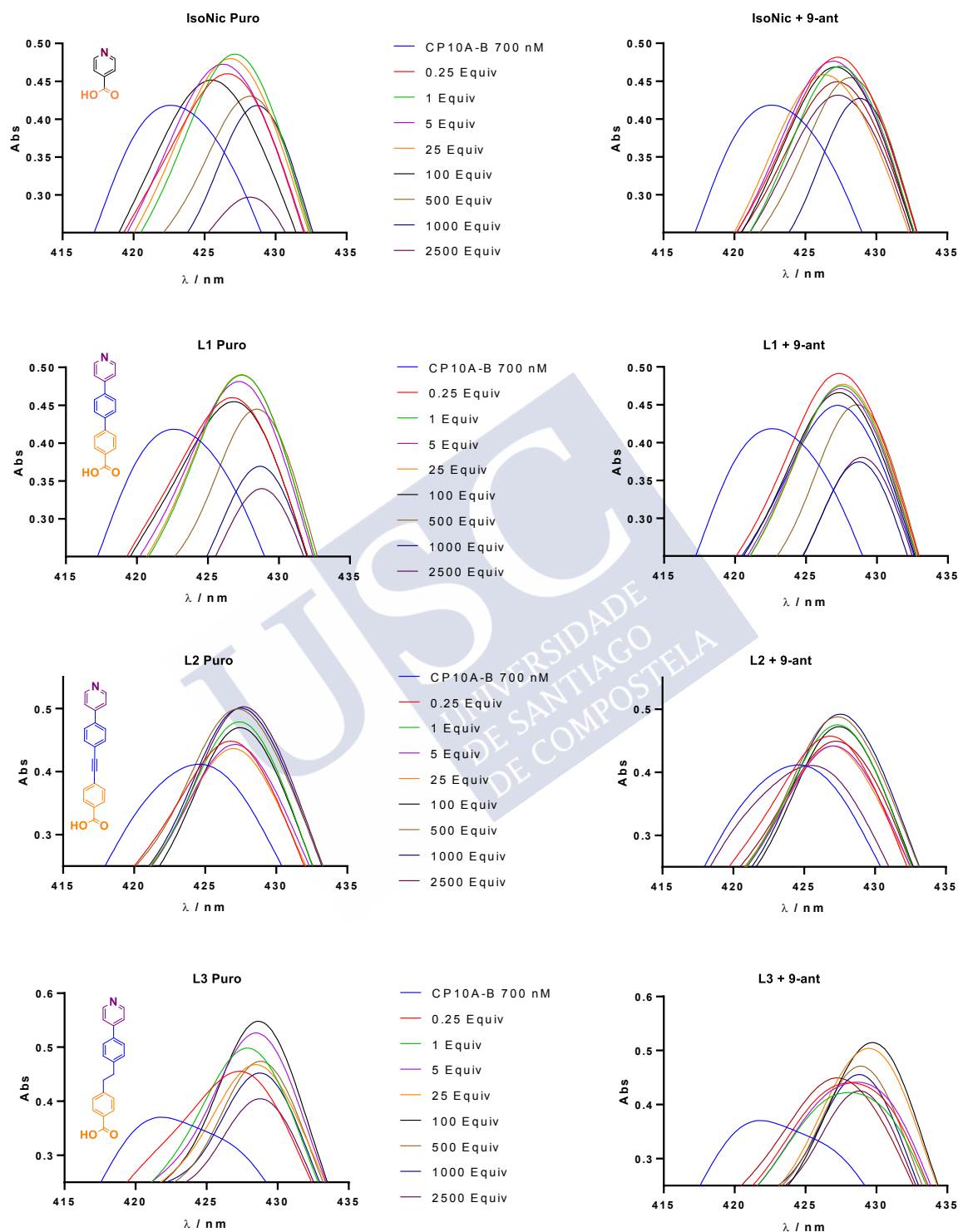


Figura 151. Mezclas de **CP10A**, **CP10B** y **L3** incubadas durante una noche en presencia (derecha arriba, líneas punteadas en la ampliación) o en ausencia (izquierda arriba, líneas sólidas en la ampliación).

A la vista de estos resultados, todo parece indicar que en presencia de pequeñas cantidades de ligando heterofuncional sí que se produce un efecto claro por parte de **9-ant**, pero a mayores cantidades este efecto de bloqueo no parece tan relevante. Por otra parte, para el estudio sistemático con el resto de los ligandos, podría ser interesante observar la progresión de la tendencia punto a punto que vemos en ausencia de **9-ant**, además de que así se logra un incremento de Abs mayor. Por todo ello, decidimos doblar el esfuerzo y realizar las valoraciones con toda la quimioteca de ligandos heterodifuncionales con y sin **9-ant** tras su mezcla durante un tiempo mayor de 12h con la mezcla de las dos hem cápsulas (**CP10A** y **CP10B**) a una concentración de 700 nM. En el caso de las muestras con ambos ligandos, como se ha descrito previamente, ambos serán incubados simultáneamente mientras se mantiene constante el número de equivalentes de **9-ant** (5 equiv) para todas las medidas. Además de los ligandos descritos hasta ahora, también decidimos estudiar el comportamiento del ligando heterofuncional más corto posible, el ácido isonicotínico (**IsoNic**), y la bipyridina **La** (Figura 152), que fue uno de los ligandos que presentaron un valor de K_a más elevado durante es estudio de la homocápsula **D10B**.⁴⁶⁴



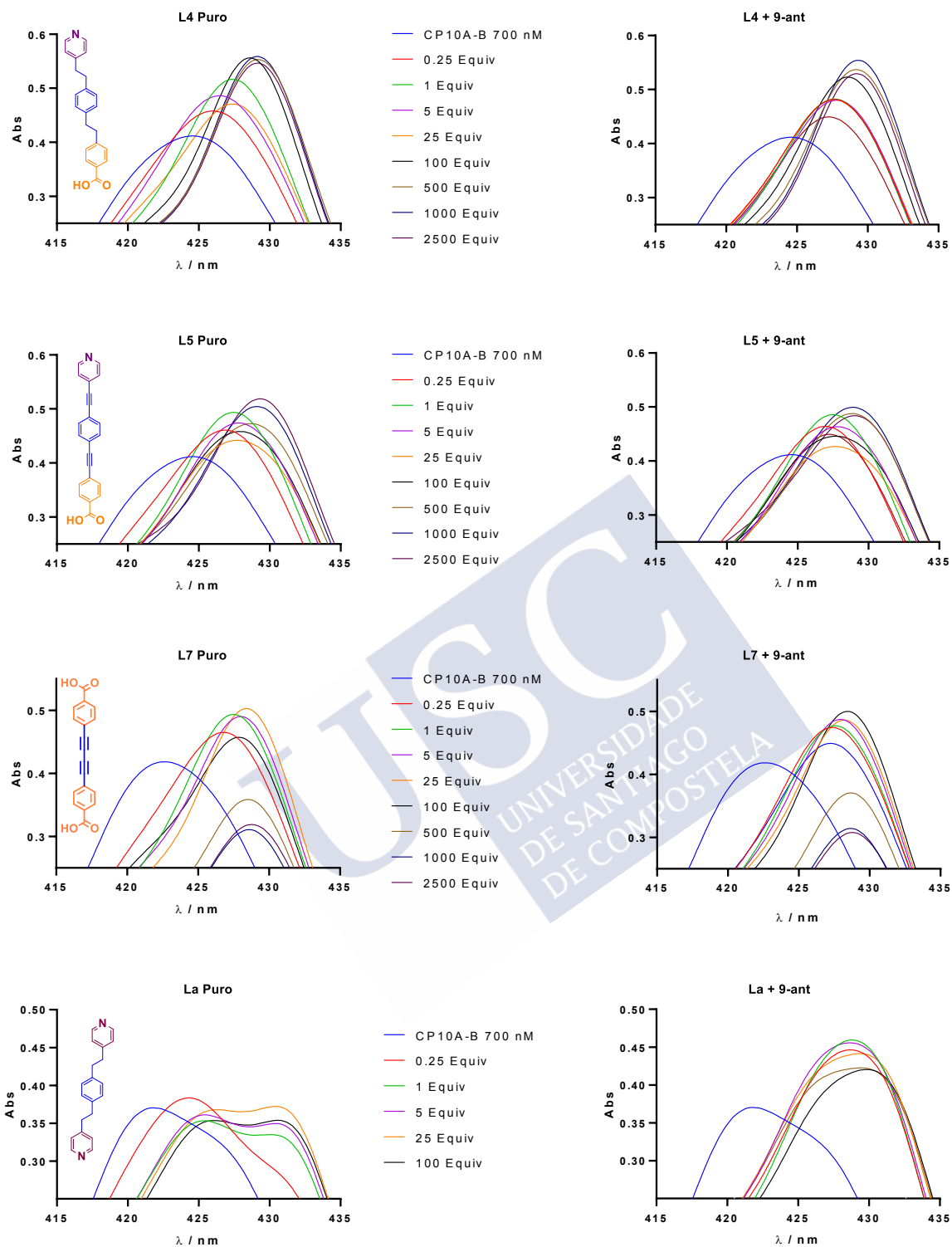
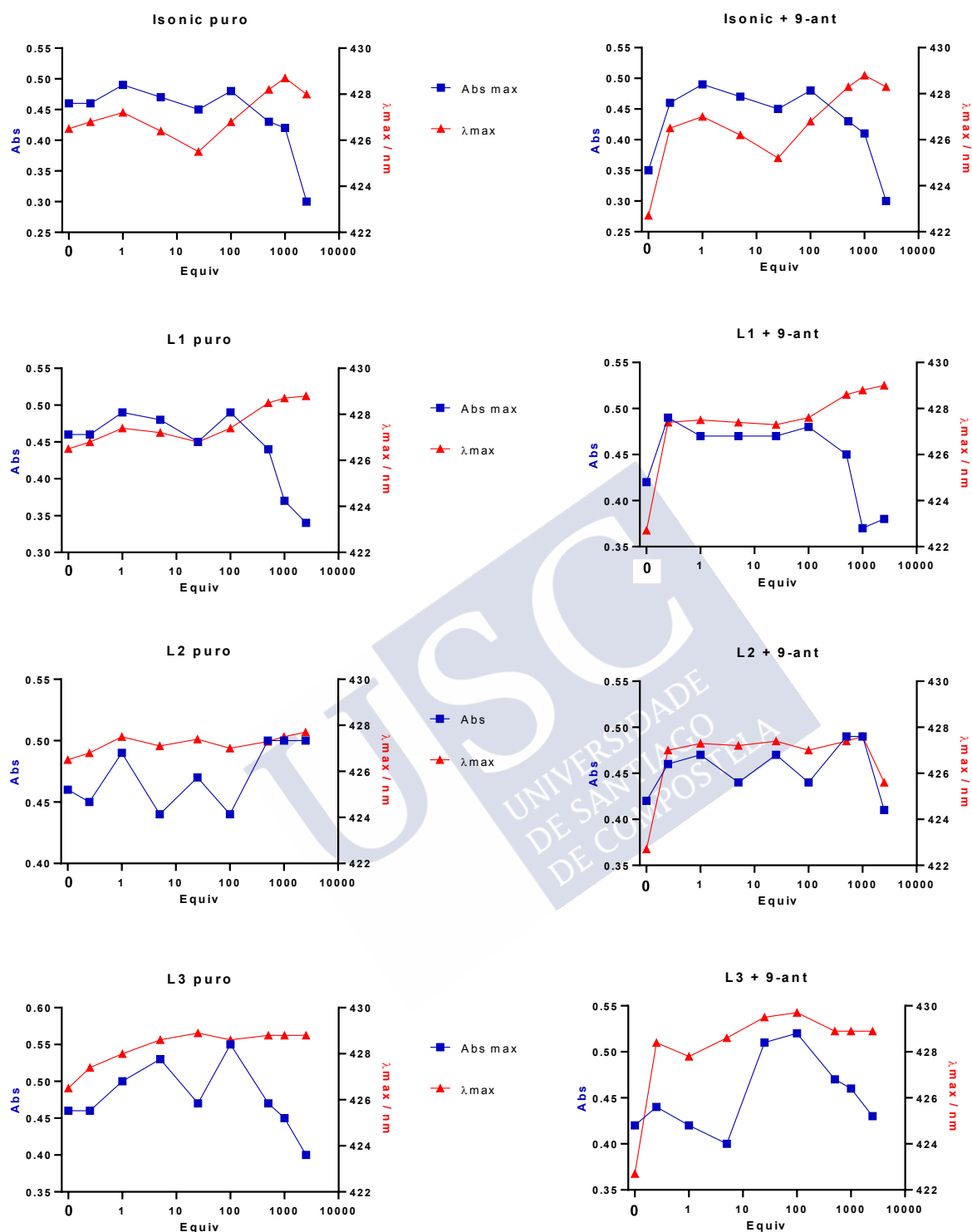


Figura 152. Ampliación de la región de la banda Soret (espectros completos en Parte Experimental) de todas las valoraciones llevadas a cabo con el sistema **CP10A-CP10B** en cantidades equimoleculares (700 nM ambos) con diferentes equivalentes de ligandos heterofuncionales (**L1-5**) y homofuncionales (dicarboxilato **L7** y dipiridina **La**).

Como se puede comprobar echando un vistazo a los resultados que se muestran en la Figura 152, analizar estas valoraciones es bastante complejo, ya que hay que considerar simultáneamente dos variables (Abs y λ_{max}), a lo largo de 8 valores de relaciones molares ligando/receptor, con 8 ligandos diferentes, en presencia o no del *stopper*. Con el objetivo de poder sacar alguna conclusión, decidimos modificar la forma de evaluar los resultados y para ello representamos el número de equivalentes de cada ligando frente a la Abs de la banda Soret y frente al λ_{max} de dicha banda. De esta forma, esperábamos que las tendencias fuesen más claras a la vista y poder realizar así un razonamiento más sistemático sobre el resultado de los experimentos (Figura 153). Además, se realizaron duplicados de las medidas, puesto que se observó que algunos de los puntos de las valoraciones se salían de las tendencias esperadas y de esta forma esperábamos minimizar la aparición de datos erráticos derivados de algún error en la manipulación de las muestras.

Si consideramos la evolución de la Abs, los resultados son tremendamente dispares. Se observa que en las valoraciones de **Isonic**, **L1** o **L7**, claramente este parámetro disminuye a medida que aumenta la relación de ligando, agudizándose especialmente este fenómeno a concentraciones muy altas de ligando (>100 equiv). Por otra parte, para **L4** la tendencia se invierte y claramente este parámetro va en aumento con los equivalentes. En el caso de **L3**, el gráfico de la Abs presenta una forma convexa cuyo máximo parece encontrarse entre 25 y 100 equiv, mientras que para el ligando largo **L5** se invierte este perfil y se observa un mínimo en esa región de equivalentes. En el caso de λ_{max} se repite la misma tendencia en todos los experimentos, ya que el valor va en aumento a medida que se aumentan los equivalentes de todos los ligandos. Para el caso particular del ligando dipiridínico **La** puro, donde no hay ningún grupo ácido carboxílico en el medio y por tanto se espera que se mantengan los dos ligandos hidroxilo axiales en torno al Sn, únicamente se observan los cambios en la banda Soret de **CP10B** (porfirina de Zn), de esta manera, mientras que la banda Soret de **CP10A** permanece estable, la banda de **CP10B** experimenta una disminución progresiva de intensidad a $\lambda = 422$ nm, mientras que se observa la aparición de otra banda nueva a $\lambda = 430.5$ nm, correspondiente a la porfirina de Zn coordinando piridina (ver parte inferior de la Figura 153).



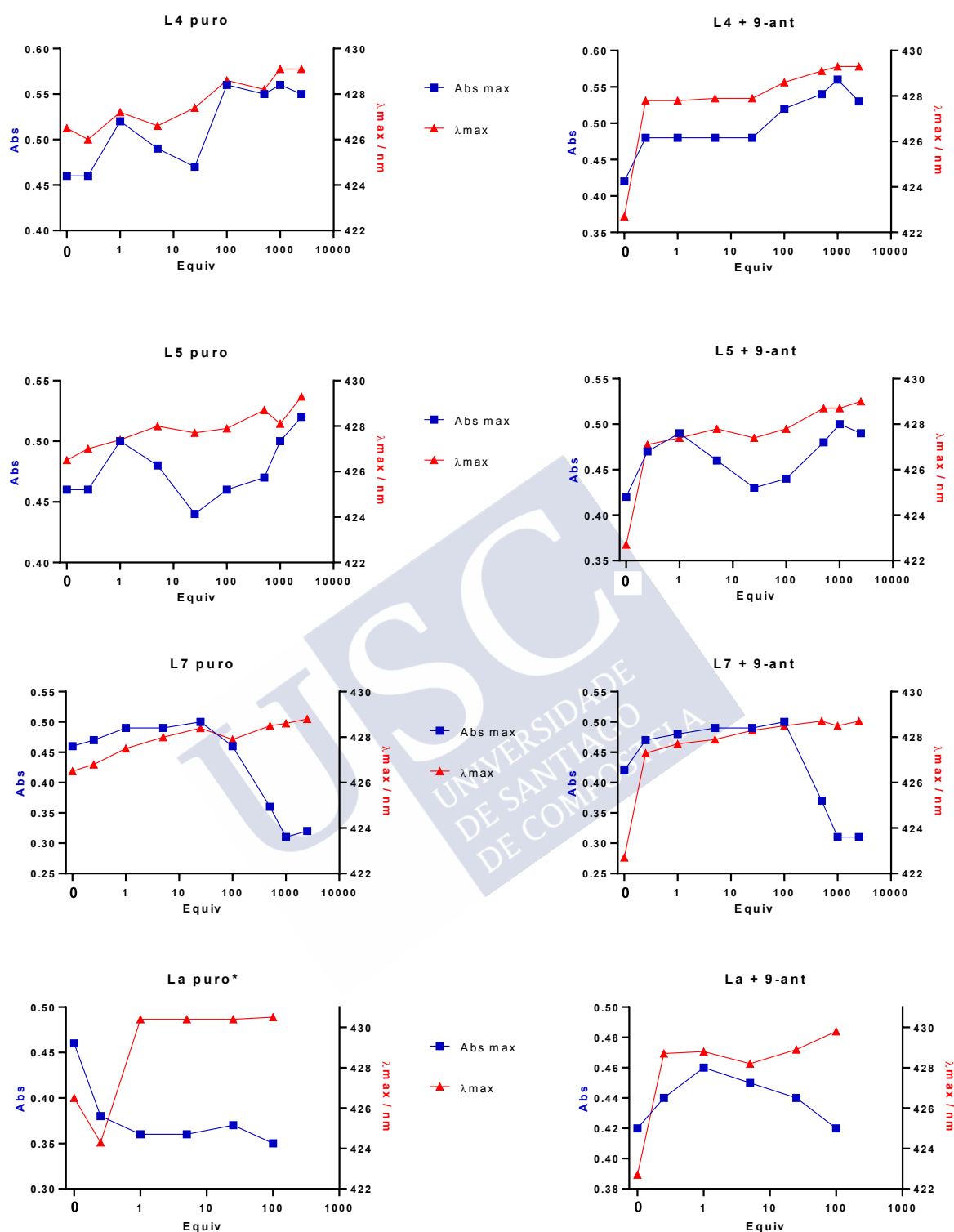


Figura 153. Evolución de las variables observables mediante UV-vis a medida que aumenta el número de equivalentes entre los diferentes ligandos y CP10A-B.^{484,485}

A continuación, decidimos llevar a cabo esta representación con todos los ligandos a la vez, para intentar observar si existe una tendencia en este caso dependiente de su longitud (Figura 154). Hay que tener en cuenta que para estos gráficos se consideraron independientemente los valores máximos de Abs y λ_{max} para cada ligando, independientemente de que fueran obtenidos con un número de equivalentes diferentes (por ejemplo: para **L3** puro, Abs_{max} se tomó del punto de 100 equiv, mientras que λ_{max} resultó darse a 2500 equiv).

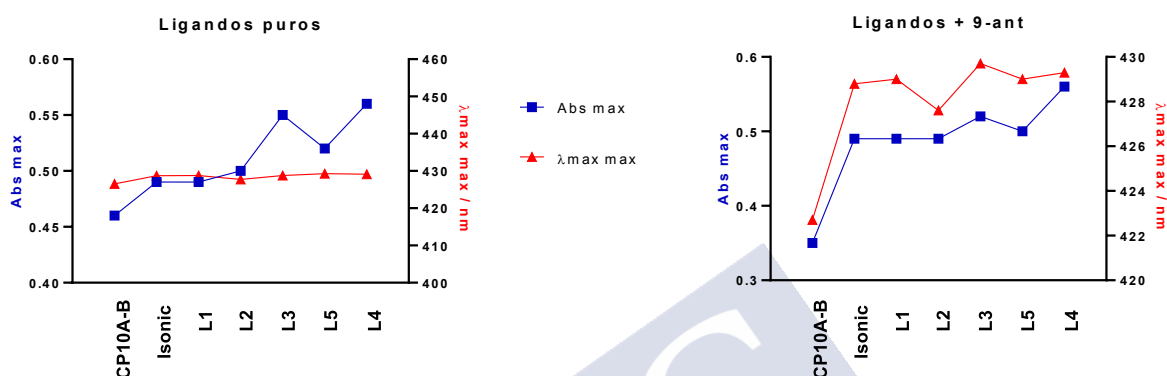


Figura 154. Variación de los valores máximos de Abs y λ_{max} para cada ligando heterofuncional, representados en orden creciente de distancia piridina-carboxilato.

A la vista de los resultados, parece que la mayor Abs se obtiene cuanto mayor sea el ligando y el mayor desplazamiento al rojo de la banda Soret se obtiene para **L5** (si consideramos los experimentos con ligandos puros) o **L3** (si consideramos los ligandos con la cara externa bloqueada), los cuales presentan longitudes estimadas de 15.8 y 17.9 Å, respectivamente. Como tendencia general, parece que en ambos casos la posición de la banda Soret tiende a desplazarse más hacia el rojo cuanto mayor sea la longitud del ligando. Si se comparan estos resultados con el estudio previo realizado con bipyridinas y **D10B**, el valor de la K_a resultó presentar un máximo claro para los ligandos en torno a 16 Å, que quizás justificase las variaciones máximas obtenidas para **L3**. De todos modos, en cuanto las longitudes diferían de esa distancia óptima, la repercusión en la K_a era crítica (por ejemplo, en el caso de un ligando en torno a 18 Å, la disminución supuso dos órdenes de magnitud con respecto a **La**), lo que no justificaría en nuestro caso las tendencias al alza en ambos indicadores al aumentar la longitud. Ante estos resultados tan complejos y contradictorios, pensamos que el uso de UV-vis, y más concretamente el análisis de los parámetros Abs y λ_{max} , podría no ser la aproximación óptima para el estudio de la complejación de ligandos heterofuncionales por parte de mezclas de **CP10A** y **CP10B**.

Intentando darle otro enfoque al estudio de encapsulación, decidimos estudiar las interacciones entre piridinilcarboxilatos y la mezcla de cápsulas mediante la técnica de dicroísmo circular (DC), ya que en el pasado había arrojado evidencias sobre la encapsulación

⁴⁸⁴ “**La puro**” presenta dos máximos diferentes a 424.3 y 430.5 nm. En esta gráfica se representa el valor de la banda más intensa, la cual cambia a medida que se aumenta la cantidad de ligando (ver Figura 152).

⁴⁸⁵ En las medidas que incluyen **9-ant** (columna derecha) el valor de 0 Equiv se refiere a la cantidad de ligando heterofuncional, ya que en todos los casos están presentes 5 equiv de **9-ant**.

de bipiridinas con las homocápsulas de Zn. El principio de esta técnica reside en que al introducirse un ligando aromático en la cavidad del dímero peptídico (entorno quiral) su libertad conformacional queda restringida y se puede observar la aparición de una señal en DC en las regiones en las que absorbe el ligando. Por así decirlo, se produce una transferencia de quiralidad entre la cápsula y el ligando encapsulado.⁴⁸⁶ En un intento de aplicar esta metodología a nuestro sistema, llevamos a cabo experimentos de DC con muestras 100 μM de **CP10A**, **CP10B** y ligandos heterofuncionales (1 equivalente). Los resultados (Figura 155) muestran un efecto Cotton positivo en torno a 435 nm, tanto en la mezcla de cápsulas como en presencia de todos los ligandos. En función del ligando heterofuncional que esté presente, tanto la intensidad de la banda como la posición del máximo varía, pero en ningún caso dichas variaciones se relacionan con las observadas en los experimentos previos de UV-vis ni con las bandas de absorción de los ligandos puros.

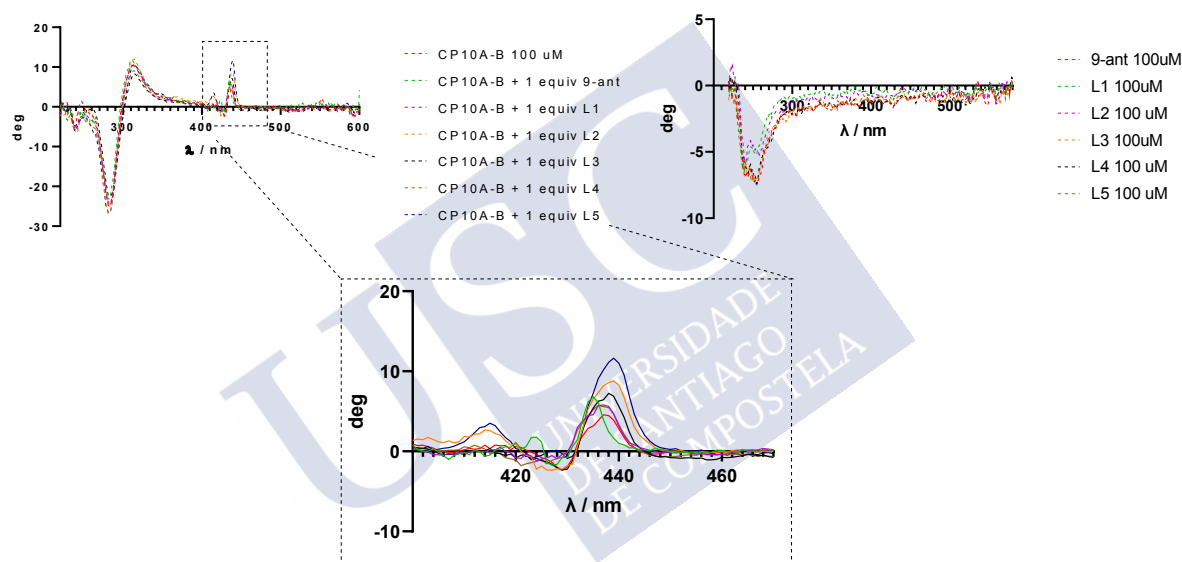


Figura 155. Experimentos de DC llevados a cabo a una concentración de muestra de 100 μM en CHCl_3 .

Como último recurso, decidimos intentar seguir el proceso de encapsulación mediante RMN. Para ello, se preparó una muestra que contuviese una disolución de **CP10A** en una mezcla 10% DMSO d_6/CDCl_3 , (5 mM), ya que la solubilidad de la cápsula mejora considerablemente en presencia de DMSO y este bajo porcentaje no tiene repercusiones en la formación de la lámina β de las especies diméricas. A continuación, sobre este tubo se añadieron cantidades crecientes de **CP10B** hasta alcanzar la equivalencia. Los espectros resultantes de estas adiciones de muestran en la Figura 156.

⁴⁸⁶ G. Gottarelli, S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chirality* **2008**, 20, 471-485. T. Kurtán, N. Nesnas, F. E. Koehn, Y.-Q. Li, K. Nakanishi, N. Berova, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5974-5982.

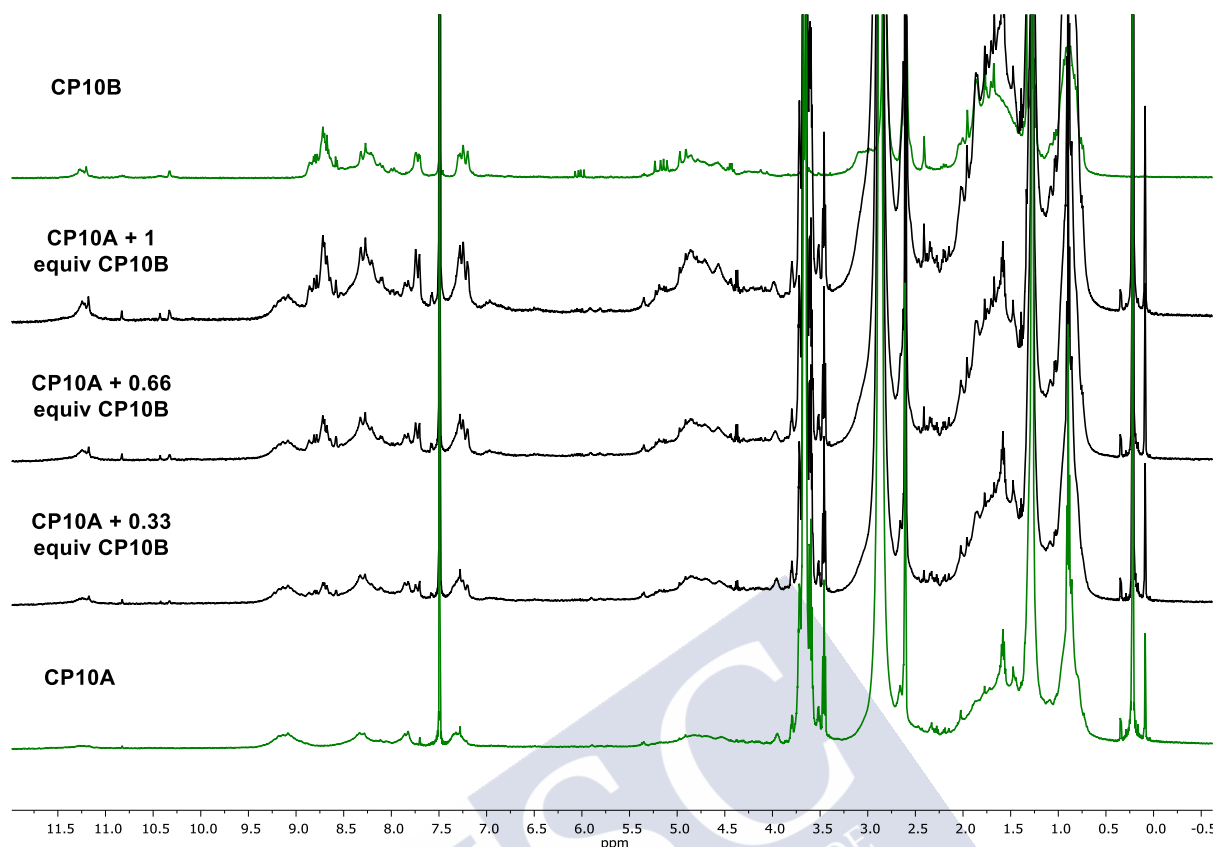


Figura 156. Espectros de ^1H RMN obtenidos de las diferentes adiciones del péptido **CP10B** sobre una disolución de **CP10A** en 10% DMSO d_6/CDCl_3 . Los espectros superior e inferior en color verde se corresponden con los compuestos puros. En esta mezcla deben de coexistir en equilibrio **D10A**, **D10B** y **D10A-B**.

Se puede observar la complejidad que presenta el espectro de protón de la mezcla, que se puede explicar en base a los diferentes equilibrios que se establecen. En primer lugar, **CP10A** y **CP10B** son capaces de autoensamblarse formando dímeros consigo mismos (homodímeros **D10A** y **D10B**) y entre ellos (heterodímero **D10A-B**). Dado que todos los dímeros derivan del mismo tipo de interacciones entre los grupos amida de los α -Aa (Leu), es de esperar que no haya grandes diferencias de estabilidad entre una especie dimérica y otra. Cada una de esas especies diméricas puede dar lugar a dos rotoisómeros (eclipsado y alternado, ver Capítulo I, Figura 73) debido a su simetría C_2 y, además, los 4 enlace hidrazona que conectan CP y porfirinas pueden presentar isomería *cis-trans*. Todas estas posibilidades podrían producir una mezcla hipotética de 24 especies en equilibrio.

A pesar de esta complejidad, decidimos probar el efecto de la adición de uno de los ligandos heterofuncionales, ya que como se explicó en el principio de esta sección, la presencia de una molécula de estas características podría inducir un proceso de *self-sorting* que simplifique enormemente el sistema, concretamente eliminando de la ecuación todas los isómeros derivados de los homodímeros. Para ello, sobre la mezcla **CP10A-B** preformada se añadió 1 equivalente del ligando **L3**, y tras un breve periodo de agitación mecánica se tomó el espectro de ^1H RMN (Figura 157), en el que no se apreciaban grandes cambios con respecto a la sustancia de partida. Se decidió continuar la agitación durante un total de 24h para luego

repetir el espectro, pensando que este proceso puede ser lento, debido a que lo más probable es que para que el ligando se introduzca en el interior de la cápsula lo tenga que hacer a través del dímero desensamblado.

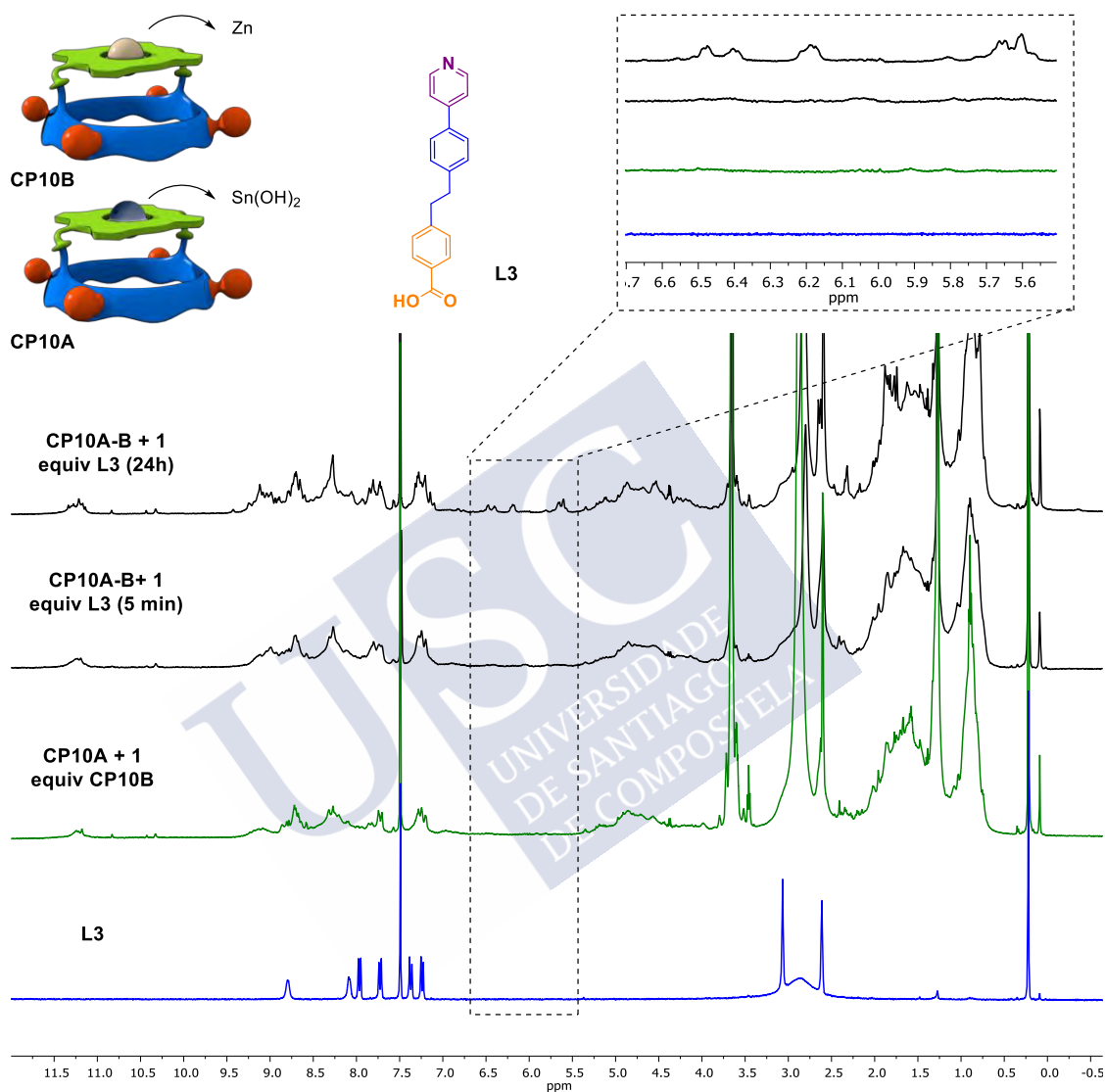


Figura 157. Incubación prolongada de **L3** con la mezcla **CP10A-B** que da lugar a nuevas señales entre 5.5 y 6.5 ppm. Los espectros fueron tomados utilizando como disolvente una mezcla de DMSO d_6 y $CDCl_3$ (1:9)

En este caso, se apreció una ligera mejoría en la definición de las señales del protón, a pesar de que la complejidad seguía siendo muy elevada. Quizás, la diferencia más destacable fue la aparición de, al menos 6 nuevos juegos de señales en la región entre 5.5 y 6.5 ppm que no se observan en los espectros de ninguna de las especies puras (**CP10A**, **CP10B** y **L3**). Experimentos de TOCSY revelaron la interconexión entre dos de estas señales y además se observó que la señal a 5.44 ppm está acoplada a otra a campo incluso más alto (4.91 ppm). Experimentos de ROESY/NOESY dieron lugar a picos de cruce entre la señal a 5.35 ppm con

una señal a un desplazamiento químico de 2.57 ppm, que dada la complejidad de la muestra no se pudo determinar inequívocamente a qué protón corresponde. La aparición de estas señales a este desplazamiento químico tras la incubación prolongada con **L3** es compatible con la formación del complejo de inclusión. El cono de apantallamiento de las porfirinas queda directamente dirigido hacia la cavidad,⁴⁸⁷ por lo tanto, cualquier ligando que se sitúe en esa zona verá el desplazamiento químico de sus protones fuertemente apantallado con respecto a su estado libre. Esto ha sido observado tanto para las porfirinas de Zn⁴⁸⁸ como para las de Sn,⁴⁸⁰ en donde las señales aromáticas más cercanas al anillo de la metaloporfirina pueden apantallarse más de 6 ppm. La aparición de señales en torno a 6 ppm, que suponen un apantallamiento de alrededor de 2-3 ppm o incluso a campo más alto, han sido observadas previamente en nuestro grupo de investigación para complejos tipo pinza entre piridinas y porfirinas de Zn en este tipo de cápsulas peptídicas.⁴⁶⁴ Factores como la separación entre ambas metaloporfirinas (15 Å) o la existencia de otros elementos en la estructura de la cápsula como por ejemplo los enlaces hidrazona pueden causar una atenuación en la influencia apantallante de la porfirina reduciendo así la $\Delta\delta$ en las señales del ligando. Para corroborar la formación del complejo de encapsulación **L3** \supset **D10A-B** se llevó a cabo un experimento de DOSY en el que se pudo comprobar la difusión de ambas especies en la misma banda de difusión, confirmando así la interacción esperada (Figura 158).

Por último, realizamos un nuevo experimento de encapsulación de un ligando heteroditópico, pero en esta ocasión usando el ligando **L6** basado en un espaciador de pireno (Figura 141). Con esto pretendíamos que la mayor superficie transversal del pireno propicie la observación de picos de cruce en experimentos tipo nOe con alguno de los protones de la cavidad interna de la cápsula. Desafortunadamente, la pobre solubilidad de este ligando en las condiciones del experimento (idénticas que para **L3**) limitó el estudio de su encapsulación por estos medios, no llegándose a observar la aparición de ninguna nueva especie en el espectro ni tras tiempos de mezcla de varios días.

⁴⁸⁷ R. J. Abraham, *Mol. Phys.* **1961**, *4*, 145-152. K. M. Smith, F. W. Bobe, O. M. Minnetian, R. J. Abraham, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3263-3272.

⁴⁸⁸ R. M. Gomila, D. Quiñero, C. Rotger, C. Garau, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deya, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 399-401.

⁴⁸⁰ J. C. Hawley, N. Bampos, R. J. Abraham, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1998**, 661-662.

⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 776-784.

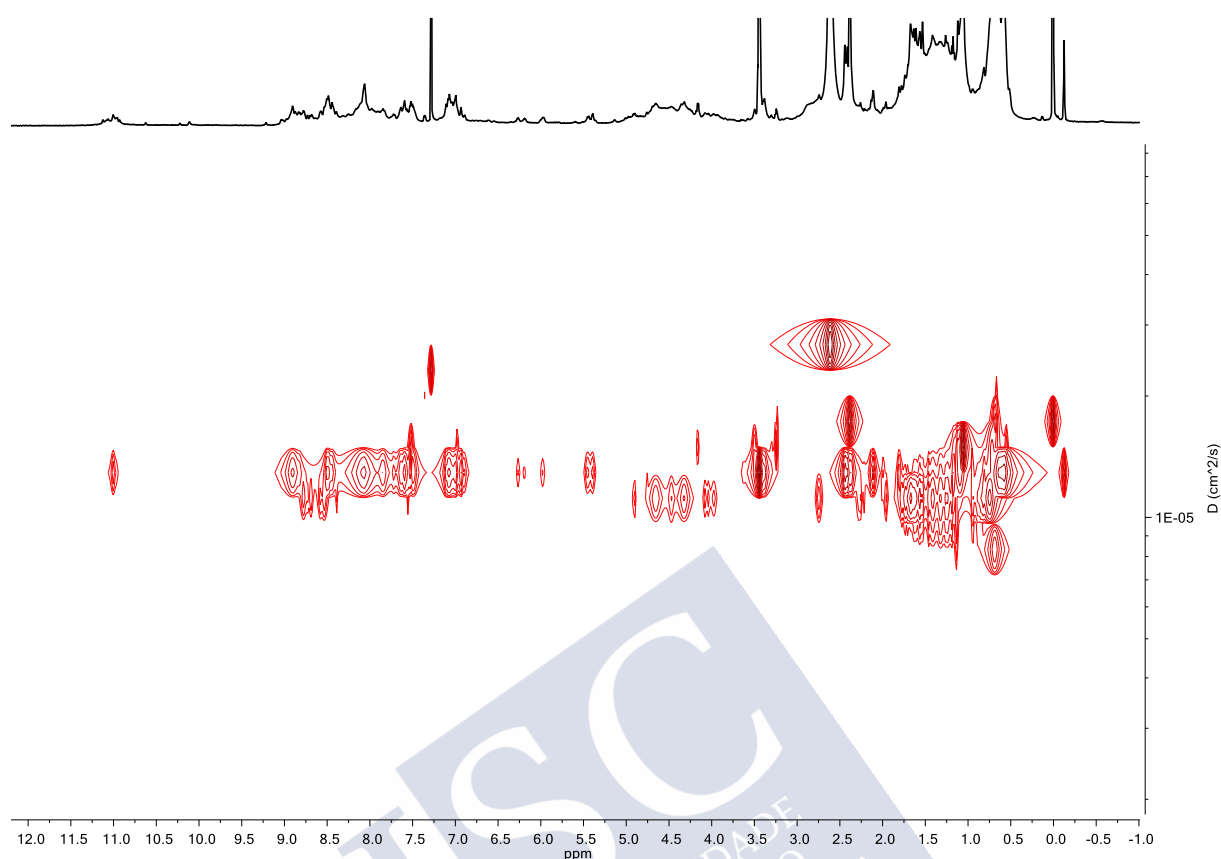


Figura 158. Experimento de DOSY de **L3-D10A-B** en donde se muestra que las señales entre 5.5 y 6.5 ppm difunden a la misma velocidad que las señales de la cápsula.

A la vista de estos resultados, parece que existen indicios que apoyan la hipótesis de la encapsulación de ligandos heteroditópicos por parte de la mezcla **D10A-B** en vista de las variaciones halladas en las valoraciones de UV-vis y, en especial, del experimento de RMN realizado con **L3**. No obstante, la caracterización del sistema en el equilibrio, así como la obtención de los parámetros termodinámicos que gobiernan el proceso de encapsulación de los diferentes ligandos no han sido factibles hasta ahora debido a la altísima complejidad del sistema. Si se renunciase al ambicioso objetivo del *self-sorting*, es probable que el análisis se facilitase mucho más en presencia de sistemas heterodiméricos de Acp-Ach como los descritos en profundidad previamente en este manuscrito,^{241b,398,464} ya que la formación muy mayoritaria de una única especie dimérica en el equilibrio reduciría considerablemente las variables que entran en juego en el proceso de encapsulación.



Conclusions

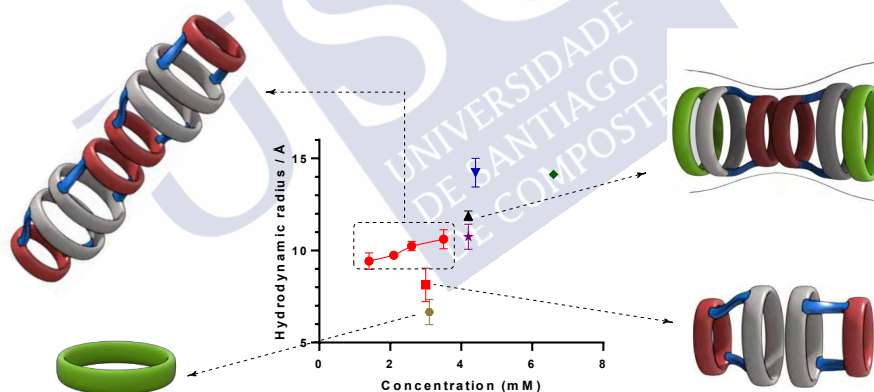




Conclusions

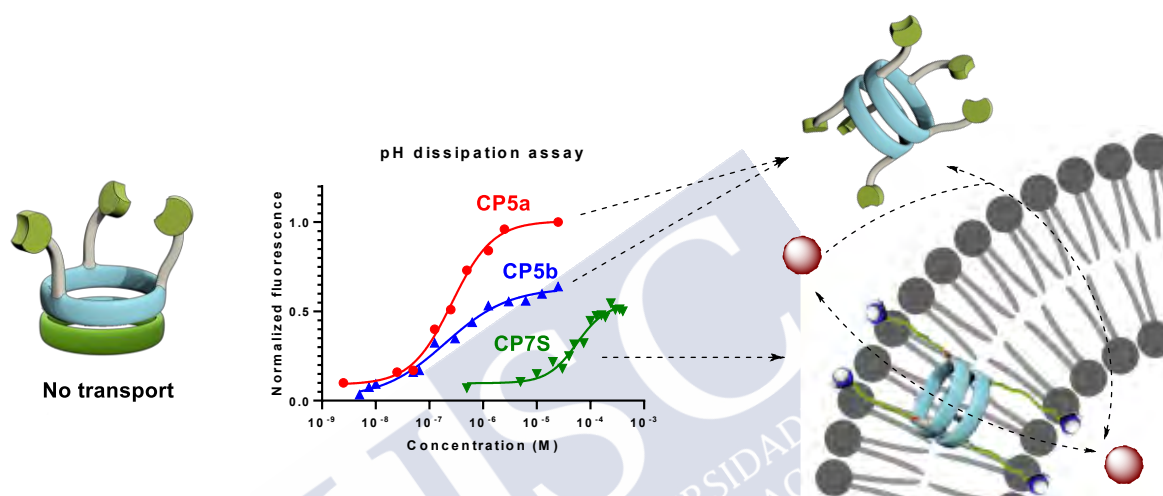
Throughout the lines of this Ph.D. dissertation we have demonstrated the versatility of α,γ -cyclic peptides to act as versatile supramolecular platforms for the development of new functional materials in fields such as material science, chemical biology and molecular recognition.

First, we have successfully linked (by means of a click chemistry procedure) a cyclic octapeptide (**CP2**) and a cyclic tetrapeptide (**CP1**), which were prepared using functionalized γ -amino acids (Fukuyama strategy) that incorporate complementary reactive groups (alkyne and azide moieties, respectively) on their amino group. This covalent adduct (**CP3**), which shows a cone-like shape, presents two opposite faces that allow its stacking by the establishment of hydrogen-bond networks at both ends. Additionally, these self-assembling dimerization processes present different values of association constant and, hence, the resulting system is able to respond to certain stimuli (solvent, temperature, concentration) that allow a shift in the equilibria between a dimeric form and a high-molecular weight aggregate. Additionally, a heterodimer-formation strategy could be implemented to prevent the growth of such aggregates, whose behavior was fully studied by NMR experiments (titrations, bidimensional and DOSY studies).

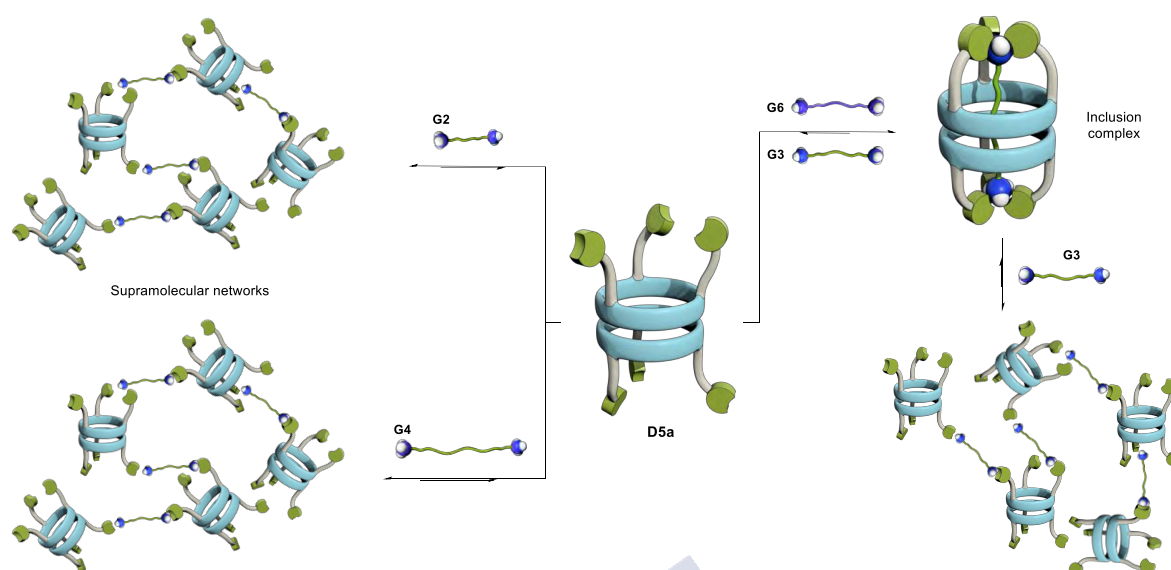


In the second Chapter of this manuscript, we used the expertise developed on the aforementioned synthetic methodology to develop a library of ionic transmembrane transporters. This library consisted on a variety of cyclic peptide scaffolds (**CP2**, **CP5-7**, **CP11**) which presented different sizes and number of reactive ends (alkyne moieties) to attach other functional chains, being in all cases highly lipophilic to ensure the insertion of the final transporters in the membranes. The first transporter family that we described was prepared after the attachment of ethyleneglycol-rich membrane-spanning pendants (**L**, **S** and **I**) that presented differences in their length and relative hydrophobicity. All of them included a primary ammonium and an azide group at their ends, to guarantee their positioning at the water-lipid interphase and click to the alkyne groups on the CPs, respectively. Straightforward pH-dissipation experiments on fluorogenic liposomes revealed poor activity for these transporters, in some cases derived from poor solubility. To overcome this problem, a new strategy was

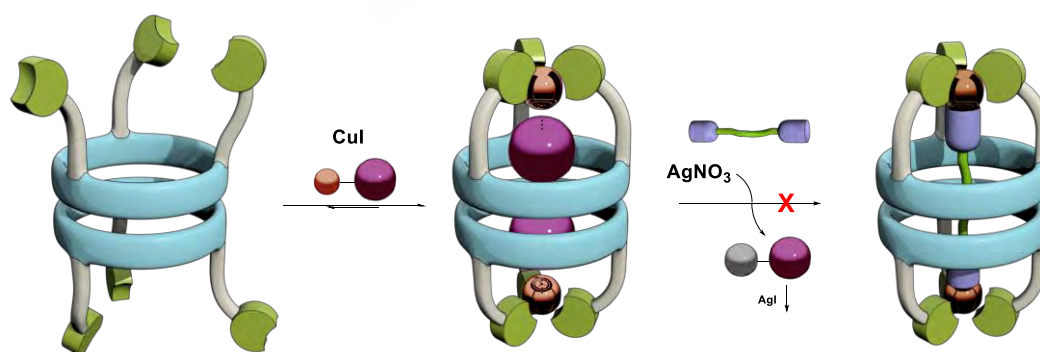
implemented in which the long PEG tentacles were swapped with pyridine rings, which resembles much more a shuttling ionophore. These new molecules (**CP5a**, **CP5b**) presented a remarkably enhanced performance on both pH dissipation experiments in vesicles and also in other anion-transport experiments. These studies revealed that this capsule-like transporter worked as a symporter ionophore in some of the experiments with excellent activities, showing EC_{50} values on the nanomolar region, in which the *orto*-pyridine capped dimer (**CP5a**) was more active than its *meta*-substituted (**CP5b**) counterpart. Interestingly, the transport ability was compromised when the transport assays were performed in the presence of a complementary cyclic peptide which formed a heterodimeric entity that presented only one pyridine bowl.



Carrying on with the study on the tri-pyridine capped dimeric scaffold, we envisioned its use as a host for different linear bifunctional guests. The first approach consisted on the tentative encapsulation of alkyl-diammonium guests of different lengths (**G2-4**), which was analyzed by ^1H NMR titrations. All guests appeared to induce a shift in the signals of both species, typical for the formation of a supramolecular complex. However, some diammonium gave rise to signal broadening at higher concentrations, which led us to the analysis of the mixture by DOSY NMR. These results suggested that the length of the guests played a major role on the encapsulation process, which appeared to be efficient only for guest **G3**. Shorter or longer guests gave rise to an increase in the observed size of the complexes, consistent with a networking phenomenon through the external surface of the dimers. Slightly bulkier ligands such as fluorinated **G6** exhibited a moderate K_a , which suggested that the cavity does not tolerate bulkier connectors between ammonium interacting groups.

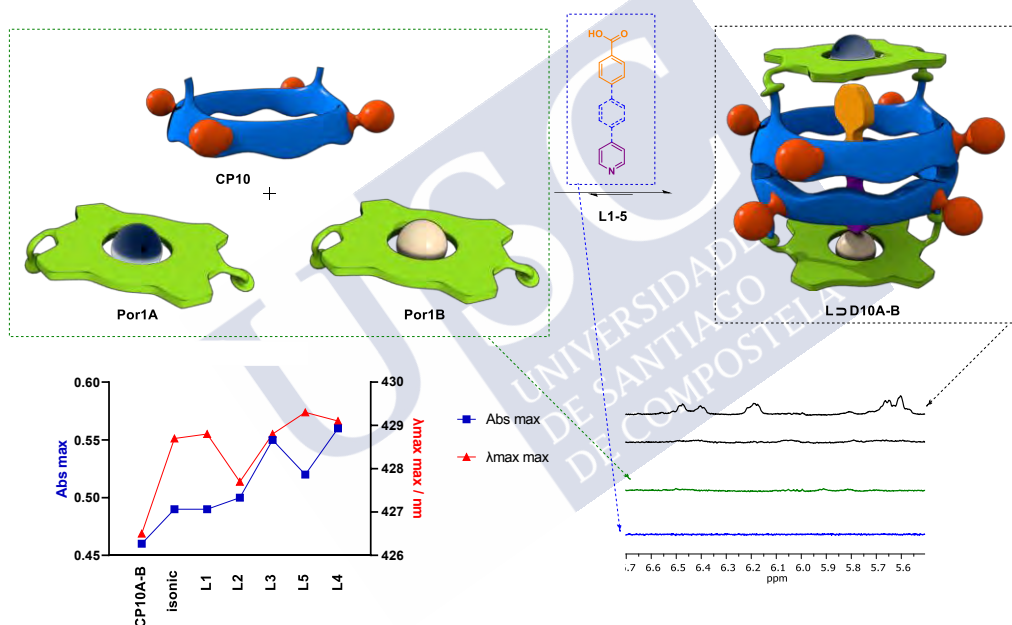


Additionally, because of the unique ability of the pyridine moiety to act as ligand for a variety of metal centers, we decide to explore the potential of the same pyridine-CP hybrid to act as a metalated capsule in which the directing group for the internalization of a suitable guest would be the metal center instead of the pyridine moieties directly. We demonstrated that air-stable Cu(I) species can be incorporated to both pyridine caps when a forth ligand presents a pseudo-covalent character (such as CuI), whereas less stable ligands led to oxidation of the metal. Nevertheless, when the removal of the iodide ligand was attempted to proceed with its substitution by a suitable bisnitrile ligand, all the samples suffered a relatively fast degradation that could be explained in terms of the oxidation of the copper centers. This process exhibited different kinetics depending on the nature of the difunctional ligand employed, especially on their length.



The last objective of this PhD work involved the synthesis and study of a different type of capsules with larger inner cavities. For this purpose, we designed **CP10**, a α,γ -cyclic octapeptide that incorporated two axial hydrazide groups to which different dialdehyde-

substituted metalloporphyrins could be attached by dynamic-covalent hydrazone bonds. With this approach, it is possible to generate half-capsules equipped with different metal center which, in this case, are the moiety in charge of directing the encapsulation on larger ligands of suitable lengths. Particularly, we focused our attention on Sn(IV) and Zn(II) (**Por1A** and **Por1B**) porphyrins which are known to efficiently coordinate pyridine and carboxylate ligands, respectively. Hence, if an equimolar mixture of both half capsules is prepared, a statistical mixture of homo- and heterocapsules would be generated but, in the presence of a complementary heterodifunctional guest, we tried to self-sort the system into the heterocapsule alone. After a series of UV-vis titrations with linear guests of different lengths containing both pyridine and carboxylate groups (**L1-5**), the results are somewhat unclear, mainly because the intrinsic complexity of the system. However, NMR studies with complementary heterodifunctional guests suggest the presence of the ligand in the inner cavity of the capsule due to the unusual chemical shifts of the guest signals as well as DOSY experiments in which a unique diffusion band is observed for both species.



Experimental Section





Experimental section

General remarks

All reagents and solvents were purchased from Iris Biotech, Fischer Scientific, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, Avanti Polar Lipids or Global Sales Manager, GL Biochem (Shanghai) Ltd, China. They were used without further purification unless otherwise stated. CH_2Cl_2 and THF were distilled from CaH_2 and Na/benzophenone, respectively, immediately prior to their use. All solvents are HPLC or synthesis grade.

Analytical thin-layer chromatography was performed on E. Merck silica gel 60 F₂₅₄ plates. In case of not been UV active (254/365 nm), the compounds were visualized by dipping the plates in appropriate revealing solutions, such as: ninydrin (2% in EtOH), Ce/Mo (200 mg $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ + 9.6 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ + 11.2 mL H_2SO_4 + 200 mL H_2O) or phosphomolibdic acid (3 g $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ in 100 mL EtOH), followed by heating. Silica-gel flash chromatography was performed using E. Merck silica gel (type 60SDS, 230-400 mesh). Mixtures for chromatography are reported as v/v ratios of the solvents noted for each compound. HPLC purification was carried out on a HITACHI D-7000 or a JASCO LC-4000 using a semipreparative Phenomenex Luna 5 μ Silica 100 Å column. Mobile phase consisted of CH_2Cl_2 /MeOH gradients detailed for each compound. Chiral stationary phase HPLC was performed on an Agilent HPLC 1100 Series (DAD detector) with a Daicel Chiralpak IC column. Size exclusion chromatography was carried out using Sephadex[®] G-25 as stationary phase.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on Varian Inova 500, Bruker AVIII-500, Varian Mercury 300 or Agilent VNMR-300. Chemical shifts (δ): are reported in parts per million (ppm), relative to *tetrakis*(trimethylsilyl)silane (δ = 0.22 ppm) or to the deuterated solvent in which the spectrum was recorded. ¹H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t) or quartet (q). All first-order splitting patterns were assigned based on the appearance of the multiplet. Non-easily interpreted signals are designated as multiplet (m) or broad (br). Carbon resonances were assigned using either Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) spectra obtained with phase angles of 135° or by Heteronuclear Single Quantum Coherence experiments (HSQC). The signals of the ¹H NMR spectra of the peptides were identified from the corresponding double-quantum-filled 2D: COSY, TOCSY and NOESY and/or ROESY spectra acquired at a concentration between 2 and 100 mM and at room temperature unless otherwise specified (mixing times for NOESY and/or ROESY ranged from 150 to 300 ms, but were not optimized). DOSY NMR experiments were performed at 298 K and without spinning the sample. The default Dbppste sequence was used and the gradients were calibrated right before the measurement to ascertain for the trustworthiness of the diffusivity data obtained. Parameters such as diffusion delay were optimized for each sample, ranging from 20-40 ms, in order to obtain a signal decay of 90 to 95% of the initial maximum peak intensity along the set of increments in the gradient values (30-80 increments were used).

Electrospray (ESI) mass spectra were recorded on a Bruker BIOTOF II mass spectrometer and are reported as mass-per-charge ratio *m/z*. Accurate mass determination (HRMS) using ESI-MS were performed on a Sciex QSTAR Pulsar spectrometer. MALDI-TOF experiments were done using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) as matrix on a Bruker Autoflex apparatus.

FT-IR measurements were made on a JASCO FT/IR-400 spectrophotometer placing the sample on a CaF₂ pellet or on a Perkin Elmer Spectrum Two ATR-FTIR, directly depositing the sample as a thin film over its diamond plate (neat).

UV/vis measurements were collected on a Cary 100 Bio, using a Hellma analytics cuvette (1cm path) at 24 °C.

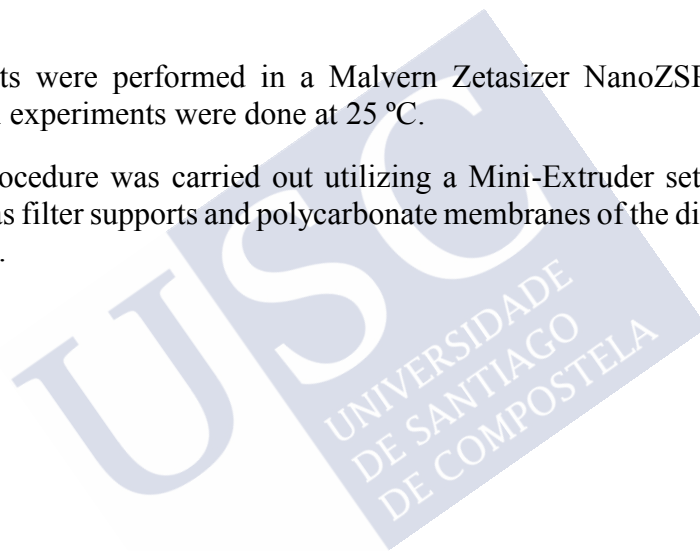
Circular dichroism measurements were performed on a Jasco J-1100 CD Spectrometer equipped with a Jasco MCB-100 Mini Circulation Bath at 24 °C.

Fluorescence assays were performed on a FluoroMax-2 spectrofluorometer (Jobin-Yvon Spex) equipped with a stirrer and a temperature controller (all experiments were carried out at 25 °C unless otherwise stated).

Optical rotation ($[\alpha]_D^T$) measurements were carried out on a Jasco DIP-370 digital polarimeter. Sodium D line wavelength was utilized, and the solvent used was HPLC grade methanol in all cases.

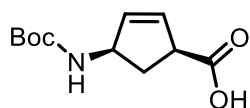
DLS measurements were performed in a Malvern Zetasizer NanoZSP using standard disposable cuvettes. All experiments were done at 25 °C.

LUV extrusion procedure was carried out utilizing a Mini-Extruder set purchased from Avanti Lipids, as well as filter supports and polycarbonate membranes of the different diameters (100, 200 and 400 nm).

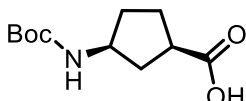


Chapter I

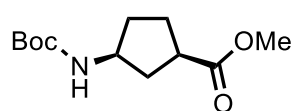
1.1. Synthesis and characterization



Boc-*L*- γ -Ace-OH (1). This γ -amino acid was obtained following the route previously developed in our research group using Vince's Lactam as commercial source.^{241b}



Boc-*L*- γ -Acp-OH (2). Cycloalkane Aa was obtained following a catalytic hydrogenation protocol described by us elsewhere.^{241b}



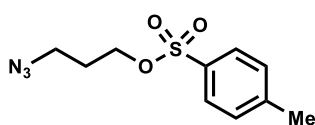
(Boc-*L*- γ -Acp-OMe) (3). Amino acid **2** (2.05 g, 8.73 mmol) was dissolved in MeOH (44 mL) and EDC·HCl (2.51 g, 13.1 mmol), HOBt (1.77 g, 13.1 mmol) and DMAP (1.60 g, 13.1 mmol) were added. The resulting solution was stirred for 2 h under Ar atmosphere. After this time, it was concentrated on a rotary evaporator and redissolved in CH₂Cl₂. The resulting solution was washed with aqueous HCl (5%, 3x50 mL) and with saturated aqueous NaHCO₃ (3x50 mL). The organic layer was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered, concentrated, and the resulting solid was purified by flash chromatography (5-20% AcOEt/hexane) to afford the desired product as a white solid [1.61 g, 76%, *R_f* = 0.78 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 4.93 and 4.45 (br, 1H), 4.04 (br, 1H), 3.67 (2s, 3H), 2.85 - 2.79 (br, 1H), 2.24 - 1.49 (m, 6H), 1.43 (s, 9H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 177.2 (C), 155.3 (C), 78.9 (C), 51.9 (CH₃), 51.8 (CH), 41.6 (CH), 36.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 28.3 (CH₃), 27.8 (CH₂). **MS (ESI)** [*m/z* (%): 266 (100). **HRMS (ESI)** Calculated for C₁₂H₂₁NO₄: 243.1471, found: 243.1473.



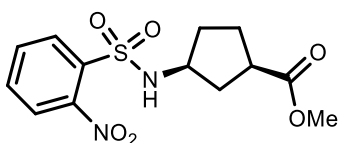
3-azidopropan-1-ol (8). Following a previously described procedure,⁴⁸⁹ 3-bromo-1-propanol (2.5 mL, 28.6 mmol) was dissolved in EtOH/H₂O (52 mL, 50 % v/v) mixture. Then, NaN₃ (7.436 g, 114 mmol) was added at room temperature and the mixture was stirred for 24 h at 70 °C. Ethanol was evaporated under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3x20 mL). The combined organic phases were dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo to give a colorless oil [2.699 g, 92%, *R_f* = 0.31 (25% AcOEt/hexane)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 3.69 (m, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.42 (br, 1H), 1.79 (q, *J* = 6.3, 2H). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃, δ): 59.7 (CH₂), 48.4 (CH₂), 31.4 (CH₂).

^{241b} R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, **44**, 5710-5713.

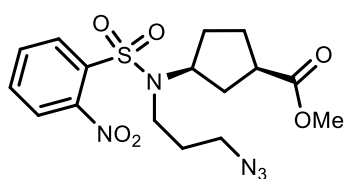
⁴⁸⁹ M. Bertoldo, G. Zampano, F. La Terra, V. Villari, V. Castelvetro, *Biomacromol.* 2011, **12**, 388-398.



3-azidopropyl-*p*-toluenesulphonate (9).⁴⁹⁰ A solution of **8** (0.909 g, 9 mmol) in CH₂Cl₂ (36 mL) was treated with Et₃N (2.5 mL, 18 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (1.80 g, 9.45 mmol). The mixture was stirred overnight and then washed with H₂O (milli-Q grade, 2x25 mL), dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated. The resulting oil was purified by flash chromatography (0-35% AcOEt/hexane) to yield the desired product as a colorless oil [2.135 g, 93%, R_f = 0.51 (25% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.93 - 1.82 (m, *J* = 6.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ): 145.0 (C), 132.7 (C), 129.9 (CH), 127.9 (CH), 67.0 (CH₂), 47.3 (CH₂), 28.4 (CH₂), 21.6 (CH₃).

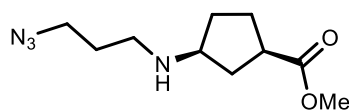


Ns-*L*-γ-Acp-OMe (4). A solution of **3** (2.62 g, 10.7 mmol) in CH₂Cl₂ (27 mL) was treated with TFA (27 mL). After 15 min, the solution was concentrated under vacuum and further dried at high vacuum for 2 h. The resulting solid was dissolved in dry CH₂Cl₂ (53 mL) and DIEA (5.8 mL, 32.9 mmol) was added, followed by *o*-nitrobenzenesulfonyl chloride (2.56 g, 16.1 mmol). The mixture was stirred for 22 h under Ar atmosphere. The solution was washed with aqueous HCl (5%, 2x50 mL) and saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x50 mL), dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by flash chromatography (15-50% AcOEt/hexane) and **4** was obtained as a yellow solid [3.05 g, 87%, R_f = 0.68 (50% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.84 and 5.33 (2d, *J* = 6.9 and 7.2 Hz, 1H), 3.61 and 3.57 (2s, 3H), 3.78 (br, 1H, H_γ), 2.76 (m, 1H), 2.18 - 1.58 (m, 6H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz, δ): 176.6 (C), 150.0 (C), 133.7 (C), 133.4 (CH), 132.8 (CH), 130.7 (CH), 125.3 (CH), 55.5 (CH₃), 52.8 (CH), 41.6 (CH), 36.4 (CH₂), 33.2 (CH₂), 27.9 (CH₂). MS (ESI) [*m/z* (%): 328 (100). HRMS (ESI) Calculated for C₁₃H₁₆N₂NaO₆S: 351.0621, found: 351.0608.

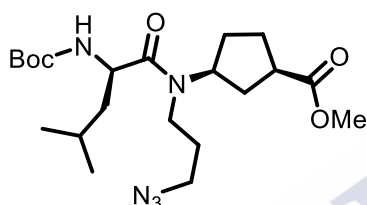


Ns-^{C3N3}N-*L*-γ-Acp-OMe (5). Protected amino acid Ns-*L*-γ-Acp-OMe (0.53 g, 1.6 mmol) was dissolved in MeCN (8.1 mL) and treated with K₂CO₃ (1.790 g, 13.0 mmol) and **9** (2.480 g, 9.72 mmol). The mixture was stirred for 24 h under Ar atmosphere and then MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was suspended in CH₂Cl₂ and washed with H₂O (2x15 mL) and brine (2x15 mL). The organic phase was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated on rotary evaporator. Purification was carried out *via* flash chromatography (10-20% AcOEt/hexane) and the entitled product was obtained as a colorless viscous oil [0.64 g, 97%, R_f = 0.33 (50% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.95 (m, 1H), 7.75 - 7.52 (m, 3H), 4.18 (br, 1H), 3.59 (2s, 3H), 3.47 - 3.09 (m, 4H), 3.09 - 2.64 (m, 1H), 2.06 - 1.52 (m, 8H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 175.9 (C), 148.1 (C), 133.8 (CH), 133.2 (C), 131.8 (CH), 130.5 (CH), 124.1 (CH), 58.7 (CH₃), 51.9 (CH), 48.9 (CH₂), 41.6 (CH₂), 40.5 (CH), 32.4 (CH₂), 30.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 26.8 (CH₂). MS (ESI) [*m/z* (%): 434 (100), 412 (60). HRMS (ESI) Calculated for C₁₆H₂₁N₅O₆S: 411.1214, found 411.1216.

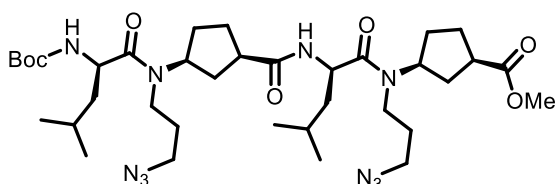
⁴⁹⁰ Y. Yuan, C.-J. Zhang, M. Gao, R. Zhang, B. Z. Tang, B. Liu, Bin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, **54**, 1780-1786.



$C^{3N3}N$ -L- γ -Acp-OMe (Aa1). Protected amino acid Ns- $C^{3N3}N$ -L- γ -Acp-OMe (0.715 g, 1.7 mmol) was dissolved in MeCN (9.0 mL) and treated with K_2CO_3 (1.20 g, 8.7 mmol) and PhSH (0.71 mL, 7.0 mmol). The mixture was stirred overnight and then acetonitrile was evaporated under vacuum. The resulting product was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with H_2O (2x25 mL) and brine (2x25 mL). The organic phase was dried over anh. Mg_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (0-8% MeOH/ CH_2Cl_2) to finally affords the desired product as white solid [0.321 g; 81%; R_f = 0.13 (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. **1H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.11 (br, 1H), 3.60 (2s, 3H), 3.45 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.35 - 3.22 (m, 1H), 2.84 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.25 (m, J = 7.2 Hz, 2H), 2.13 - 1.67 (m, 6H). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 175.7 (C), 59.1 (CH_3), 51.9 (CH), 48.9 (CH_2), 44.7 (CH_2), 42.0 (CH), 34.3 (CH_2), 29.9 (CH_2), 27.3 (CH_2), 27.2 (CH_2). **MS (ESI)** [m/z (%): 227 (100), 156 (10). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{10}H_{19}N_4O_2$: 226.1430, found 226.1431.

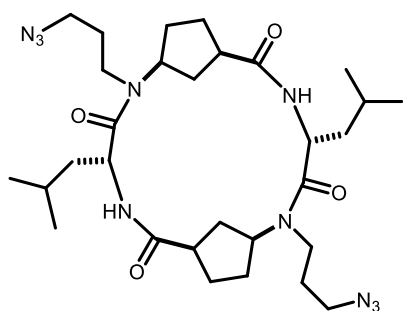


Boc-D-Leu- $C^{3N3}N$ -L- γ -Acp-OMe (dip1). A solution of Aa1 (0.320g, 1.4 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was treated with DIEA (0.50 mL, 2.8mmol). In another round bottom flask, Boc-D-Leu-OH (0.346 g, 1.5 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (5 mL) and then successively treated with N -HATU (0.820 g, 2 mmol) and DIEA (0.67 mL, 3.6 mmol). Then both solutions were combined and stirred during 4 h under Ar atmosphere. After this time, the mixture was washed with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). The resulting organic phase was dried over anh. Mg_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (15-20% AcOEt/hexane) to afford mentioned product as a transparent oil [0.552 g, 92%, R_f = 0.68 (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. **1H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 5.23 (d, J = 9.1 Hz, 0.65H), 5.12 (d, J = 9.3 Hz, 0.35H), 4.69 - 4.40 (m, 1.35H), 4.29 - 4.13 (m, 0.65H), 3.65 (2s, 3H), 3.44 - 3.09 (m, 4H), 2.90 - 2.63 (m, 1H), 2.26 - 1.26 (m, 20H), 0.99 - 0.83 (m, 6H). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 75 MHz, δ): 175.7 (C), 172.9 (C), 155.5 (C), 79.4 (C), 57.7 (CH_3), 51.8 (CH), 51.7 (CH), 49.47 (CH_2), 48.8 (CH_2), 43.3 (CH), 40.9 (CH_2), 39.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 28.3 (CH_3), 26.9 (CH_2), 24.6 (CH), 23.4 (CH_3). **MS (ESI)** [m/z (%): 440 (100), 462 (15). **HRMS (ESI)** Calculated for $C_{21}H_{37}N_5O_5Na$: 462.2687, found 462.2687.



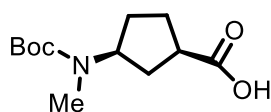
Boc-(D-Leu- $C^{3N3}N$ -L- γ -Acp) $_2$ -OMe (tet1). Previously obtained dipeptide dip1 was divided into two portions. The first fraction (0.280 g, 0.6 mmol) was dissolved in a MeOH/ H_2O mixture (3:1, 13 mL) and then LiOH (0.077 g, 3.2 mmol) was added. After stirring for 1 h, MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous phase was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, it was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL), dried over anh. Mg_2SO_4 , filtered and concentrated to yield a white foam. The other portion of the same dipeptide (0.280 g, 0.6 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.5 mL) and treated with TFA (3.5 mL). After stirring for 15 min the

mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated for 3 times and finally dried under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and DIEA (0.224 mL, 1.3 mmol) was added. Subsequently, the first portion residue was dissolved again in dry CH_2Cl_2 (5.5 mL) and subsequently treated with DIEA (0.447 mL, 2.6 mmol), and *N*-HATU (0.293 g, 0.77 mmol). Finally, both mixtures were combined and stirred for 3 h under Ar atmosphere. The resulting solution was washed saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3x20 mL) and aqueous HCl (5%, 3x20 mL). Then the organic layer was dried over anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting foam was purified by flash chromatography (30-50% AcOEt /hexane) to yield the desired product as a white foam [0.475 g, 99%, R_f = 0.30 (50% AcOEt /hexane)]. **MS (ESI)** [m/z (%)] 769 (100), 747 (30). **HRMS (ESI)** Calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{NaO}_7$: 769.4695, found: 769.4661.

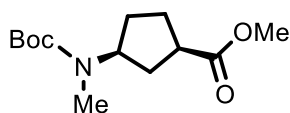


ϵ -[(*D*-Leu-^{C³N³}*N*-L- γ -Acp)₂] (CP1). Linear tetrapeptide **tet1** (0.383 g, 0.52 mmol) was dissolved in a $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (3:1, 10.8 mL) and then LiOH (62 mg, 2.6 mmol) was added. After stirring for 1 h, MeOH was evaporated under vacuum and the aqueous mixture was acidified with aqueous HCl (5%) to pH 2. Then, the aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (4x15 mL). The combined organic extracts were dried over anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to yield white foam. A fraction of the resulting residue (97 mg,

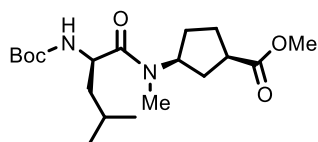
0.13 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.3 mL) and treated with TFA (1.3 mL). After stirring for 15 minutes, mixture was concentrated in the rotary evaporator, diluted in CH_2Cl_2 and concentrated (3 times) and dried under high vacuum for 3 h. Finally, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (660 mL) and DIEA (140 μL , 0.81 mmol) and PyAOP (65 mg, 0.13 mmol) were added. The mixture was stirred under Ar atmosphere and, after 14 h, DIEA (0.046 mL, 0.27 mmol) and PyAOP (0.033 g, 0.067 mmol) were added. 5 h after the addition, the solvent was reduced until 5% of its initial volume and then washed with an aqueous solution of NH_4Cl (sat., 2x20 mL) and NaHCO_3 (sat., 2x20 mL). The resulting organic layer was dried with anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and concentrated. The solid was purified *via* HPLC (silica gel, 4-6% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ over 30 min) to yield the desired cyclic tetrapeptide **CP1** as a white solid [166.1 mg, 52%, R_f = 0.34 (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)]. **^1H NMR** (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.32 (m, 2H, NH), 4.95 (m, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 3.35 (m, 4H), 3.15 (m, 2H), 2.91 (br, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.84 (m, 4H), 1.67 (m, 4H), 1.47 (m, 6H), 0.92 (m, 14H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 177.1 (C), 174.6 (C), 56.4 (CH), 48.8 (CH), 48.1 (CH), 41.6 (CH_2), 41.2 (CH_2), 40.8 (CH_2), 31.1 (CH_2), 28.5 (CH_2), 25.8 (CH_2), 24.9 (CH_2), 23.3 (CH), 22.2 (CH_3). **FT-IR** (293 K, CHCl_3) 3301 (amide A), 2100 (azide), 1668, 1624 (amide I), 1528 (amide II) cm^{-1} . **HRMS (ESI)** Calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}_{10}\text{O}_4$: 615.4087, found 615.4089.



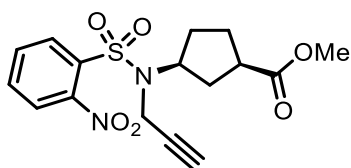
Boc-MeN-L- γ -Acp-OH (6). This compound was prepared following a previously described protocol.^{241b}



Boc-^{Me}N-L- γ -Acp-OMe (Aa2). A solution of **6** (0.780 g, 3.21 mmol), EDC·HCl (0.923 g, 4.81 mmol), HOBt (0.650 g, 4.81 mmol) and DMAP (0.587 g, 4.81 mmol) in MeOH (16 mL) was stirred at r.t. for 1 h. After this time the solution was concentrated to dryness and the resulting residue dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL) and washed with aqueous solutions of NaHCO₃ (sat., 2x15 mL) and HCl (5%, 2x15 mL). The organic layer was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated. The resulting residue was purified *via* flash chromatography (5-20% AcOEt/hexane) to afford **Aa2** as a colorless oil [0.607 g; 74%; R_f = 0.57 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 4.52 (br, 1H), 3.78 - 3.63 (s, 3H), 2.73 (m, 4H), 2.19 - 1.54 (m, 6H), 1.52 - 1.40 (m, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 176.1 (C), 155.5 (C), 79.1 (C), 69.5 (CH₃), 51.5 (CH₂), 41.1 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 27.1 (CH₃). MS (ESI) [m/z (%): 280 (100) HRMS (ESI) Calculated for C₁₃H₂₃NNaO₄: 280.1519, found: 280.1520.

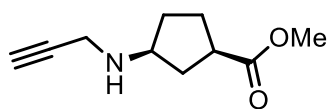


Boc-D-Leu-^{Me}N-L- γ -Acp-OMe (dip2). **Aa2** (0.317 g, 1.2 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of CH₂Cl₂ and TFA (12.5 mL). The solution was stirred for 10 min and then it was concentrated on the rotary evaporator, diluted in CH₂Cl₂ and concentrated again (3x), with additional drying under high vacuum for 3 h. The resulting residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (12.4 mL) and successively treated with DIEA (1.4 mL, 7.4 mmol), Boc-D-Leu-OH (0.305 g, 1.32 mmol) and N-HATU (0.547 g, 1.44 mmol). The resulting solution was stirred for 2 h under Ar atmosphere and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 2x30 mL) and NaHCO₃ (sat., 2x30 mL). The organic layer was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified *via* flash chromatography (20-40% AcOEt/hexane) to give the desired dipeptide **Boc-D-Leu-^{Me}N-L- γ -Acp-OMe** as a white foam [0.260 g, 60%, R_f = 0.77 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.49 - 5.22 (m, 1H), 5.08 - 4.67 (m, 1H), 4.66-4.22 (m, 1H), 3.73 - 3.63 (m, 3H), 3.01 - 2.74 (m, 4H), 2.20 - 1.18 (m, 18H), 1.13 - 0.83 (m, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ): 175.7 (C), 173.1 (C), 155.5 (C), 79.4 (C), 56.7 (CH₃), 54.5 (CH), 52.0 (CH), 49.3 (CH), 43.5 (CH₃), 41.7 (CH₂), 35.9 (CH), 31.8 (CH₃), 30.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 23.4 (CH₂), 21.8 (CH₃). HRMS (ESI) Calculated for C₁₉H₃₄N₂NaO₅ 393.2360, found: 393.2360.

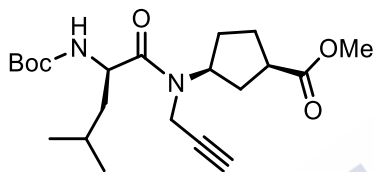


Ns-^{prop}N-L- γ -Acp-OMe (7). Protected amino acid Ns-L- γ -Acp-OMe (1.259 g, 3.8 mmol) was dissolved in MeCN (19 mL) and treated with K₂CO₃ (2.10 g, 15.2 mmol) and propargyl bromide (80%, 1.978 g, 13.3 mmol). The mixture was stirred for 5 h under Ar atmosphere and then acetonitrile was evaporated under reduced pressure. The residue was suspended in CH₂Cl₂ (25 mL) and washed with H₂O (milli-Q grade, 3x25 mL) and aqueous solution of NaCl (sat., 3x25 mL). The organic phase was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated on rotary evaporator. The residue was purified by flash chromatography (20-30% AcOEt/hexane) and the title product was obtained as a yellow viscous oil [1.31 g, 97%, R_f = 0.65 (50% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.18 - 8.06 (m, 1H), 7.76 - 7.53 (m, 3H), 4.41 - 4.19 (m, 1H), 4.17 (2d 2H), 3.74 - 3.56 (s, 3H), 2.95 - 2.64 (m, 1H), 2.24 - 1.79 (m, 7H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ): 176.0 (C), 148.0 (C), 133.8 (CH), 133.5 (C), 131.8 (CH), 131.2 (CH), 124.2 (CH), 79.4 (C), 73.1 (CH), 58.8 (CH), 58.3 (CH₃), 51.9 (CH), 40.7 (CH), 32.9 (CH₂), 32.6 (CH₂), 28.5

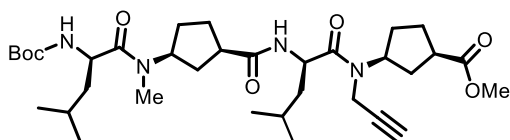
(CH₂), 26.9 (CH₂). **MS (ESI)** [*m/z* (%): 240 (60), 367 (35). **HRMS (ESI)** Calculated for C₁₆H₁₈N₂NaO₆S: 389.0778, found: 389.0776.



propN-L-γ-Acp-OMe (Aa3). A solution of Ns-*propN-L-γ-Acp-OMe* (1.120 g, 3.1 mmol) in MeCN (15 mL) was treated with K₂CO₃ (2.142 g, 15.5 mmol) and PhSH (1.25 mL, 12.4 mmol). The resulting mixture was stirred for 18 h and then the solvent was removed under vacuum. The residue was suspended in CH₂Cl₂ and washed with H₂O (milli-Q grade, 2x15 mL) and aqueous solution of NaCl (sat., 2x15 mL). Finally, the organic layer was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by flash chromatography (25-40% AcOEt/hexane) to afford the desired *N*-functionalized **Aa3** [0.390 g, 69%, *R_f* = 0.26 (75% AcOEt/hexane)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 4.14 - 3.86 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.43 - 3.13 (m, 3H), 2.69 (m, 1H), 2.21 - 1.13 (m, 7H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, δ): 176.3 (C), 82.2 (C), 71.1 (CH), 57.5 (CH₃), 51.6 (CH), 42.1 (CH), 36.5 (CH₂), 36.2 (CH₂), 32.1 (CH₂), 27.4 (CH₂). **MS (ESI)** [*m/z* (%): 182 (100). **HRMS (ESI)** Calculated for C₁₀H₁₆N₁O₂: 182.1176, found: 182.1175.



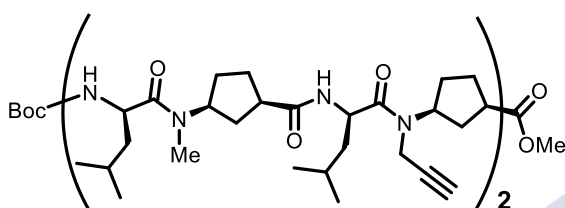
Boc-D-Leu-*propN-L-γ-Acp-OMe* (dip3). A solution of **Aa3** (0.390 g, 2.2 mmol) in dry CH₂Cl₂ (22 mL) was successively treated with DIEA (1.5 mL, 8.6 mmol), Boc-*D*-Leu-OH (0.548 g, 2.4 mmol) and *N*-HATU (0.980 g, 2.58 mmol). The resulting solution was stirred under Ar for 1 h and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 2x20 mL) and NaHCO₃ (sat., 2x20 mL). The organic layer was dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (7-30% AcOEt/hexane) to give the desired dipeptide **Boc-D-Leu-*propN-L-γ-Acp-OMe*** as a colorless oil [0.688 g, 82%; *R_f* = 0.80 (50% AcOEt/hexane)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.49 and 5.11 (2d, *J* = 8.92, 1H), 4.88 - 4.57 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.21 - 3.83 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 3.06 - 2.71 (m, 1H), 2.43 - 1.07 (m, 19H), 1.05 - 0.81 (m, 6H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, δ): 175.8 (C), 172.5 (C), 155.3 (C), 80.4 (C), 72.7 (C), 57.6 (CH₃), 51.7 (CH), 48.6 (CH), 42.0 (CH₂), 41.0 (CH), 32.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 28.2 (CH₃), 27.8 (CH₂), 27.4 (CH₂), 24.5 (CH₃), 23.4 (CH), 21.6 (CH). **HRMS (ESI)** Calculated for C₂₁H₃₄N₂O₅Na: 417.2360, found: 417.2362.



Boc-D-Leu-*MeN-L-γ-Acp-D-Leu-propN-L-γ-Acp-OMe* (tet2,3). A solution of **dip2** (0.217 g, 0.55 mmol) in a MeOH/H₂O mixture (3:1, 11 mL) was treated with LiOH (0.066 g, 2.8 mmol). After stirring for 1 h, MeOH was removed under reduced pressure and the aqueous phase was acidified with an aqueous solution of HCl (5%) to pH 2. The resulting aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (4x15 mL), and the combined organic layers were dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated to yield a white foam that was dried under vacuum.

A solution of **dip3** (0.200 g, 0.54 mmol) in a 1:1 mixture of CH₂Cl₂ and TFA (5.4 mL) was stirred for 15 min and then concentrated in the rotary evaporator. The residue was dissolved in

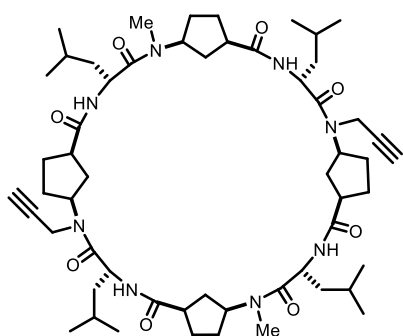
CH₂Cl₂, concentrated (3 times) and finally dried under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.7 mL) and DIEA (0.38 mL, 2.2 mmol) was added. Subsequently, the previous portion was also dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.7 mL) and then DIEA (0.19 mL, mmol) and *N*-HBTU (0.246 g, 0.64 mmol) were added in this order. Finally, both mixtures were combined and stirred for 3 h under Ar atmosphere. After this time, the solution was washed with aqueous solutions of NaHCO₃ (sat, 2x15 mL) and HCl (5%, 2x15 mL), and then dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The resulting residue was purified by column chromatography (30-50% AcOEt/hexane) to yield the desired product as a foam [0.340 g, 96%, *R_f* = 0.20 (50% AcOEt/hexane)]. **MS (ESI)** [*m/z* (%): 633 (100), 655 (60). **HRMS (ESI)** Calculated for C₃₄H₅₆N₄O₇Na: 655.4041, found 655.4038.



Boc-(D-Leu-^{Me}N-L-γ-Acp-D-Leu-^{prop}N-L-γ-Acp)₂-OMe (oct2,3). A solution of **tet2,3** (0.165 g, 0.26 mmol) in a mixture MeOH/H₂O (3:1, 4.2 mL) was treated with LiOH (0.031 g, 1.31 mmol) and stirred at room temperature for 1 h. After this time, MeOH was evaporated under reduced pressure and the resulting aqueous

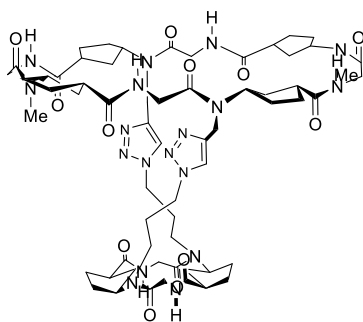
solution was acidified with an aqueous solution of HCl (5%) to pH 2. The acidic aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (4x10 mL) and the combined organic portions were dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuo. A second separate fraction of **tet2,3** (0.160 g, 0.26 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of CH₂Cl₂ and TFA (5.4 mL). Then, it was stirred for 15 min at ambient temperature and concentrated in the rotary evaporator. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and concentrated (3 times) to be finally dried under high vacuum for 3 h. Finally, the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.2 mL) and treated with DIEA (0.15 mL, 0.70 mmol).

The fraction with the free carboxy group was dissolved in freshly distilled CH₂Cl₂ (2 mL) and then DIEA (0.070 mL, 0.35 mmol) and *N*-HBTU (0.097 g, 0.25 mmol) were added. After two min this solution was poured onto the other mixture and the resulting phase was stirred under Ar for 2 h at r.t.. After that time, the solution was washed with aqueous portions of HCl (5%, 2x15 mL) and NaHCO₃ (sat., 2x15 mL). The organic layer was dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated at reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) to give the title compound as a foam [0.213 g, 85%, *R_f* = 0.30 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **MS (ESI)** [*m/z* (%): 567 (100), 1133 (55). **HRMS (ESI)** Calculated for C₆₂H₁₀₁N₈O₁₁: 1132.7512, found 1132.7516.



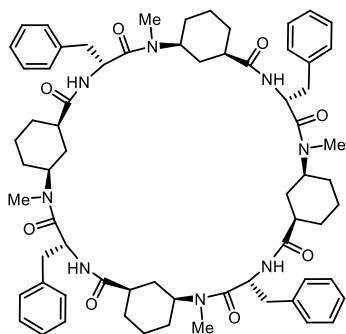
c-[*(D*-Leu-^{Me}*N*-*L*- γ -Acp-*D*-Leu-^{prop}*N*-*L*- γ -Acp-)]₂ (**CP2**). A solution of linear octapeptide **oct2,3** (0.186 g, 0.16 mmol) in a mixture MeOH/H₂O (3:1, 3.2 mL) was treated with LiOH (0.020 g, 0.82 mmol). After stirring for 1 h at r.t., the MeOH was removed on the rotary evaporator and the resulting solution was acidified with an aqueous solution of HCl (5%) to pH 2. This solution was extracted with CH₂Cl₂ (4x10 mL) and the combined organic extracts were dried, filtered and concentrated in vacuo. The resulting foam was dissolved in a mixture of CH₂Cl₂ (1.5 mL) and TFA (1.5 mL) and stirred for

15 min. The solution was concentrated, and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ and concentrated (3 times). It was further dried under high vacuum for 3 h. This residue was suspended in dry CH₂Cl₂ (50 mL) and DIEA (0.16 mL, 0.30 mmol) and *N*-TBTU (0.096 g, 0.30 mmol) were added. This mixture was left to stir during 15 h and additional DIEA (0.16 mL, 0.30 mmol) and *N*-TBTU (0.036 g, 0.12 mmol) were added. After 6 h, the solution was washed with aqueous solutions of HCl (5%, 2x10 mL) and NaHCO₃ (2x10 mL). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) to give the **CP2** as a white solid [0.099 g; 60%; *R_f* = 0.47 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.35 (d, *J* = 9.5 Hz, 1.2 H), 8.26 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.8 H), 8.20 (d, *J* = 9.5 Hz, 0.9 H), 8.14 (d, *J* = 9.5 Hz, 1.1 H), 5.10 (m, 4H), 4.80 - 4.55 (m, 6H), 3.82 (td, *J* = 13.7 and *J* = 2.2 Hz), 3.08 (m and 2s, 10H), 2.21 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.12 - 1.38 (m, 36H) 0.95 - 0.78 (m, 24H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 125 MHz, δ): 175.4 (C), 174.7(C), 174.1(C), 173.3 (C), 80.2 (C), 72.5 (C), 55.4 (CH), 54.6 (CH), 47.0 (CH), 46.9 (CH), 43.3 (CH), 42.2 (CH), 41.5 (CH₂), 34.3 (CH₂), 32.6 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.2 (CH₃), 28.0 (CH₂), 27.7(CH₂), 26.9 (CH₂), 26.7 (CH), 24.8 (CH), 23.5 (CH₃), 22.1 (CH₃). **FT-IR** (293 K, CHCl₃) 3308 (amide A), 1673, 1632 (amide I), 1540 (amide II) cm⁻¹. **HRMS (ESI)** Calculated for C₅₆H₈₉N₈O₈: 1001.6798, found: 1001.6794.

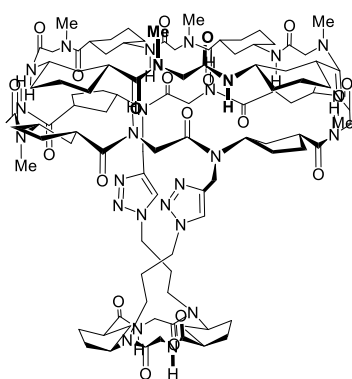


CP3. Both cyclic peptides **CP2** (6.0 mg, 0.006 mmol) and **CP1** (4.3 mg, 0.007 mmol) were dissolved in freshly distilled and degassed (Ar flow, 20 min) CH₂Cl₂ (6 mL) and then solutions of DIEA (65 μ L, 0.285 M), TBTA (64 μ L, 0.005 M) and [Cu(MeCN)₄PF₆] (64 μ L, 0.012 M) in freshly distilled and degassed CH₂Cl₂ were added. The resulting mixture was stirred overnight under Ar atmosphere. The resulting turbid solution was concentrated under reduced pressure and re-suspended in a 10% MeOH/CHCl₃ mixture. This solution was filtered, and the

filtrate was purified by semi-preparative normal-phase HPLC (5-8% MeOH/CH₂Cl₂ over 30 min) to give the adduct product as a white solid [4.8 mg, 48%, *t_R* = 15 min]. **¹H RMN** (CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 1.45 H), 8.32 (d, *J* = 9.3 Hz, 0.45), 8.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 0.55H), 8.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 1.55H), 8.02 - 7.89 (2s, 2H), 6.60 (brm, 0.55H), 6.37 (brs, 1.55H) 5.35 - 5.21 (m, 2H), 5.19 - 5.06 (m, 2H), 4.87 - 4.53 (m, 14H), 4.45 - 4.22 (m, 2H), 3.62 - 3.49 (m, 2H), 3.32 - 2.64 (m, 22H), 2.31 - 1.08 (m, 58H), 1.03 - 0.83 (m, 36H). **FT-IR** (293 K, CHCl₃) 3304 (amide A), 1679, 1620 (amide I), 1531 (amide II) cm⁻¹. **HRMS (ESI)** Calculated for C₈₆H₁₃₉N₁₈O₁₂: 1616.0811, found: 1616.0814.



c-[(D-Phe-L-MeN-Ach)-4] (CP4). This CP was prepared following a protocol previously described in our group.⁴⁹¹ ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.57 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.24 - 7.12 (m, 20H), 5.36 - 5.29 (m, 4H), 4.50 - 4.42 (m, 4H), 3.04 (m, 4H), 2.96 - 2.89 (m, 4H), 2.85 - 2.77 (m, 4H), 2.66 (s, 12H), 1.90 - 0.79 (m, 24H).



Heterodimer of c-[(D-Phe-L-MeN-Ach)-4] (CP4) with CP3 (D3-4). To an NMR tube containing a solution of **CP4** (4.5 mg, $2.78 \cdot 10^{-3}$ mmol) in CDCl₃ (400 μ L) portions of a stock solution of **CP4**⁴⁹¹ (7.3 mg, $6.38 \cdot 10^{-3}$ mmol) in CDCl₃ (230 μ L) were successive added. Hence, samples containing a ratio of 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 equivalents of **CP4** to **CP3** were prepared in the same experimental run. In case of any excess **CP4** being added, it was possible to purify the mixture to separate the heterodimer to the excess of any cyclic octapeptide by normal-phase HPLC (3-7.5% MeOH/CH₂Cl₂ over 30 min, t_R = 24 min for the **D3-4** and t_R = 20 min for **CP3**). ¹H RMN (5% MeOH d_3 /CDCl₃, 500 MHz,

δ): 8.64 - 8.57 (m, 4H), 8.47 - 8.42 (m, 4H), 7.85 (s, 2H), 7.18 - 7.00 (m, 20H), 6.58 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.34 - 4.96 (m, 8H), 4.92 - 4.69 (m, 4H), 4.69 - 4.44 (m, 8H), 4.37 - 4.19 (m, 8H), 0.89 - 0.77 (m, 36H). **FT-IR** (293 K, CHCl₃): 3298 (amide A) 1669, 1618 (amide I), 1530 (amide II) cm⁻¹. **HRMS (ESI)** Calculated for C₁₈₂H₂₂₃N₁₆O₈: 2760.7529, found 2760.7535.

⁴⁹¹ M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja *Chem.-Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.

1.2. Determination of the enantiopurity of compound **1** by chiral HPLC

After the enantiomeric resolution of **1** with (*R*)-1-phenylethanamine (3 to 4 crystallizations), a solution of i.e., 5 mg in a mixture of hexane:ⁱPrOH (1 mL, 9:1) was analyzed by quiral HPLC using an isocratic method of 3% ⁱPrOH/hexane at 1 mL/min for 30 minutes. The e.e. was determined comparing the areas of the peaks at 15.7 minutes (*L* enantiomer) and 13 minutes (*R* enantiomer) by the following formula:

$$e.e. = \frac{Area_L - Area_D}{Area_L + Area_D} \quad (10)$$

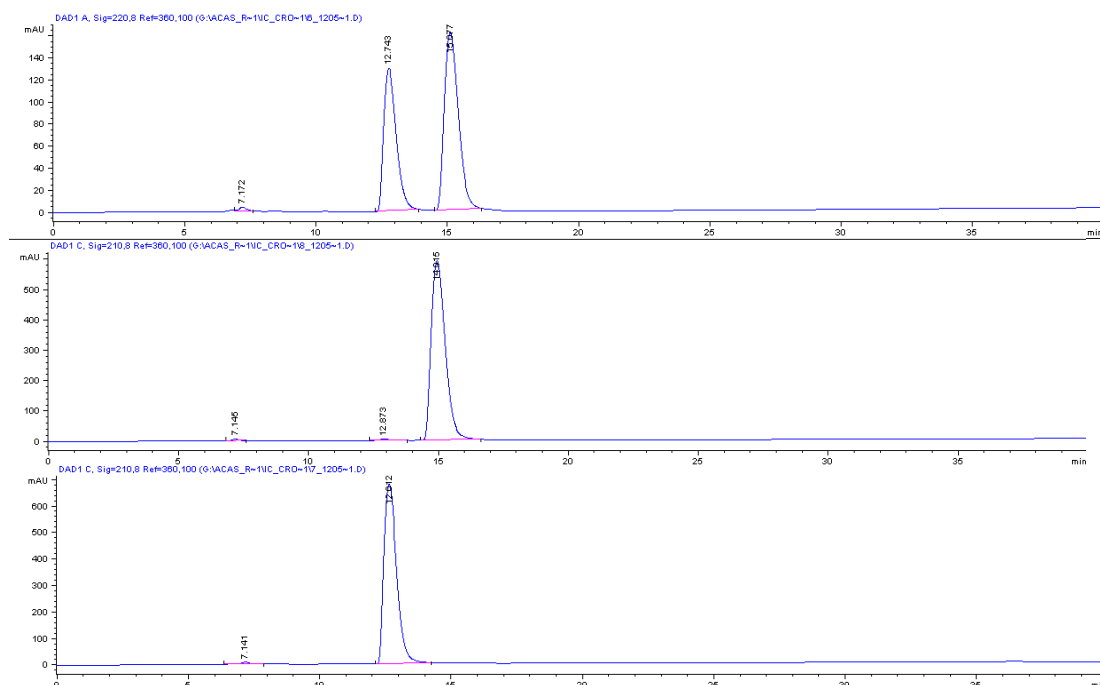


Figure 1. Chromatograms resulting from quiral HPLC analysis of enantioenriched fractions of **1**. From top to bottom: reference sample containing a mixture of both enantiomers, slightly enriched in *L*; enantiopure *L* sample used for further peptide synthesis showing 99% e.e.; enantiopure *D* fraction.

1.3. NMR dimerization analysis

Different samples containing solutions of **CP1** in CDCl_3 were prepared at concentrations ranging from 1 to 40 mM. For each sample, ^1H NMR spectra were recorded at various temperatures; from -40 to $+40$ °C ($\Delta T = 20$ °C). For each set of temperatures, the chemical shift of the NH protons (6.2 to 7.3 ppm) was accurately determined using the chemical shift of CHCl_3 (7.26 ppm) as reference and plotted versus the concentration of the sample (see Figure 75).

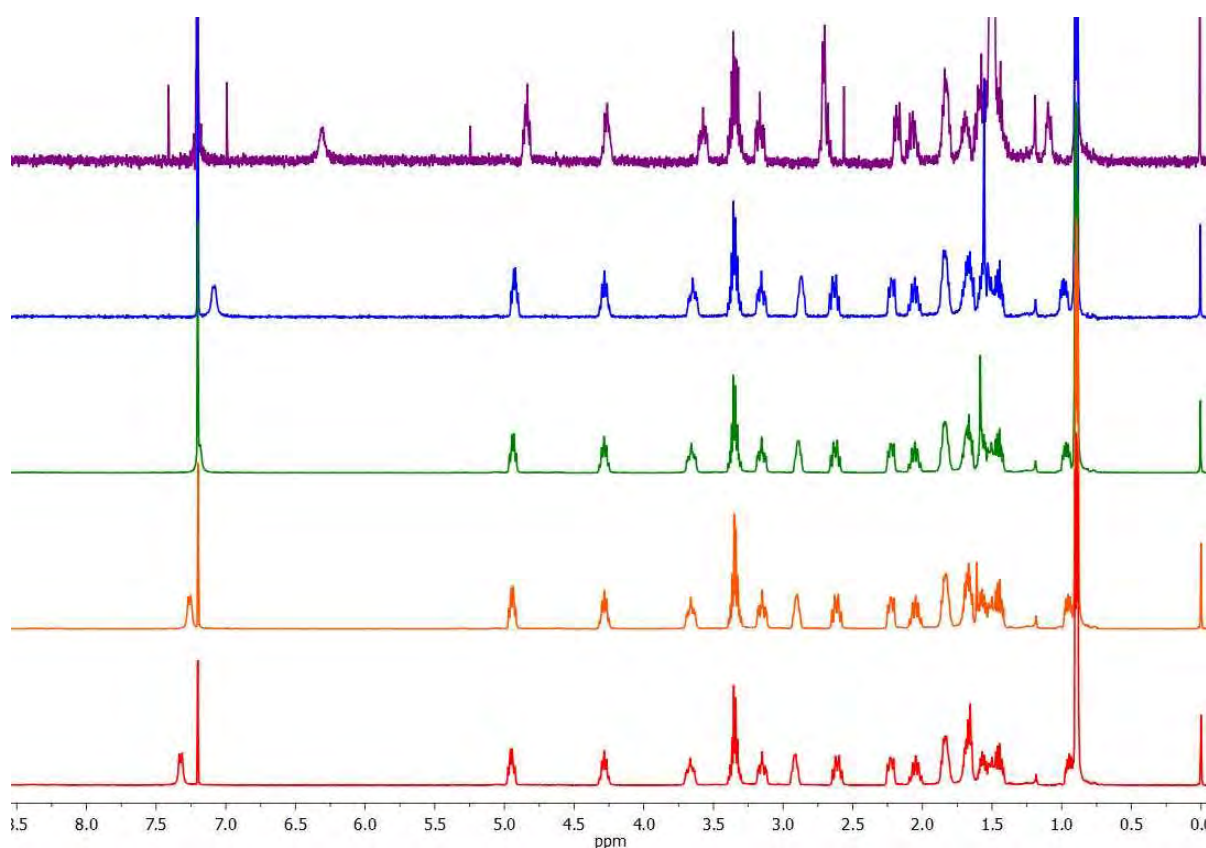


Figure 2. Variable concentration NMR analysis of **CP1** in CDCl_3 at 293 K. From top to bottom: 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM.

1.4. ΔT ^1H NMR experiments on CP3/NT3

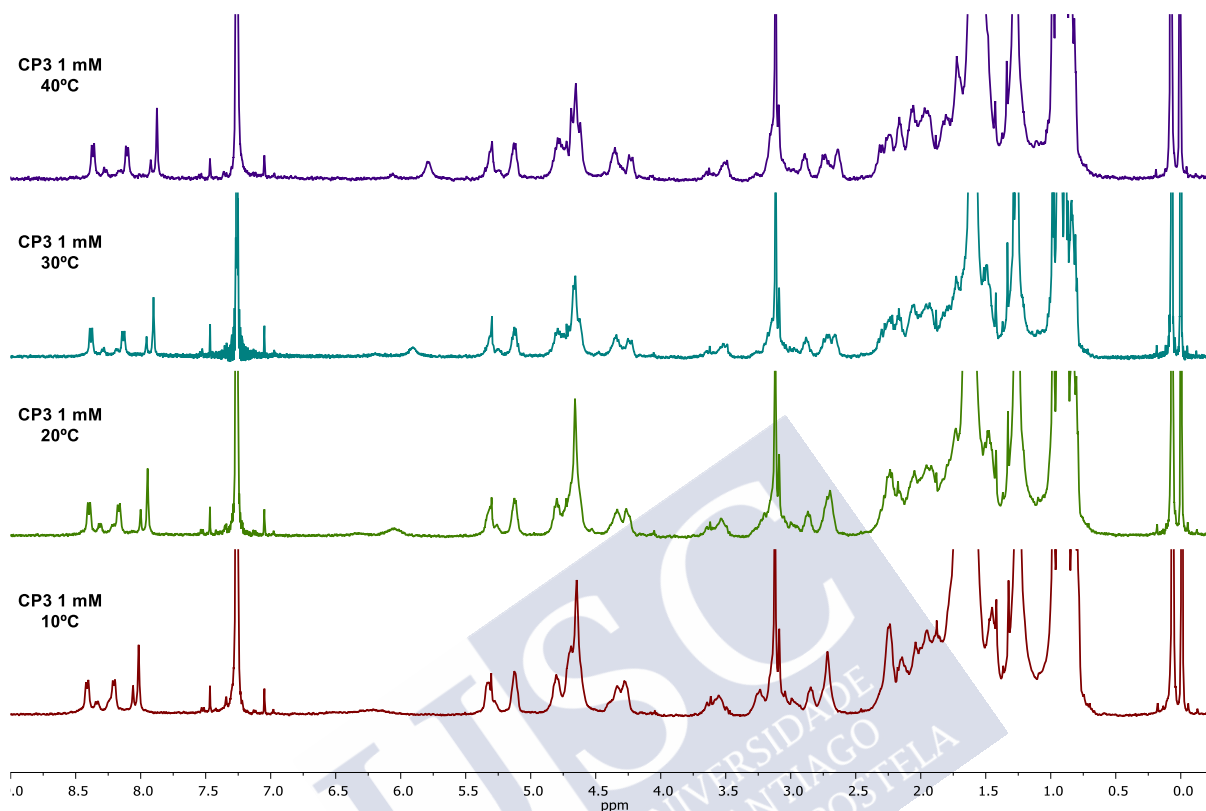


Figure 3. Variations on the ^1H NMR spectra upon the modification of the temperature at which they are recorded.

1.5. DOSY experiments

The samples were prepared by dissolving previously purified (HPLC) CPs in either pure CDCl_3 or a 1% $\text{MeOH } d_3$ solution in CDCl_3 , a solvent system which allowed the disruption of high molecular weight aggregates in certain samples without having a remarkable influence on the viscosity of the medium, which is a critical factor in this technique. Also, due to our interest in quantifying apparent diffusion radii, the samples included *tetrakis*(trimethylsilyl)silane (TMSS) as internal standard. The concentration of TMSS was different for each sample, but a constant ratio of $[\text{TMSS}] = 1.2 [\text{Sample}]$ was maintained throughout the whole study. We found this ratio to be optimal in terms of TMSS signal's decay in the experiments as long as, due to its small size, its decay is much more accused along the gradient as compared to the larger peptide adducts that are object of this study. Also, we considered that the peptides and the internal standard have independent diffusion rates, as no interactions were observed in NOESY experiments. DOSY NMR. Each sample was measured twice or three times in order to check the reproducibility of the measurement and to obtain an average of the diffusion data used to determine hydrodynamic radii.

For each sample, a certain peak in the ^1H NMR spectra was used in order to obtain the ratio between the observed diffusion of TMSS and the target supramolecular assemblies. The selection of the signal was not arbitrary but chosen to ensure the highest signal-to-noise ratio, in order to avoid incorrect weightings. For each system the selected signals were as follows:

- TMSS (constant throughout all experiments): Singlet at 0.22 ppm.
- D3** (both in CDCl_3 and 1% MeOH d_3/CDCl_3): Singlet at 3.13 ppm (N-Me of **CP3**).
- Heterodimers **D3-4** (all stoichiometries): Singlet at 3.06 ppm (N-Me of **CP3**).

In these systems the rate of equilibration is higher than the time scale of the diffusion experiments, thus, a single horizontal row (Diffusion scale) is observed for the supramolecular systems, which is a weighted average of the individual contributions of monomer, dimers, trimers, etc. that are present in solution (Figura 81).

In order to analyze the diffusion data, we decided to consider the protocol established by Maccioni *et al.*³⁹⁴ In this direction, we first considered an approximation to the Einstein-Stokes equation 3, in which two correction factors are included to the original expression; c_s which responds to the fact that these aggregates do not present an apparent r_h larger than 20 Å and also the f_s factor, which accounts for the asymmetry in the shape of some of the tubular aggregates. Hence, in our case:

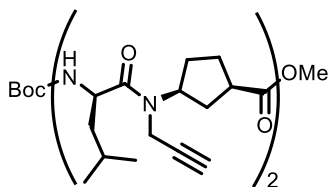
- $c_s = 5.85$, estimating an average size of 10-15 Å and following Chen plots.³⁹⁵
- $f_s = 1.00$ for **D4**, **D3** (1.4 mM to 2.6 mM) and **D3-4** 1:1 and 1:2; 1.05 for **D3** (3.5 mM) and **D3-4** 1:3, considering a prolate (cylinder-like) aggregate is being formed.³⁹⁶

Both these factors are known for TMSS, thus it is possible to establish a relationship (Eq. 5) between the apparent diffusion of TMSS and that of the sample as follows, that allows the obtention the parameter of interest r_{sample} :

$$D_t = \frac{kT}{c(r_{\text{sol}}, r_h) f_s(a, b) \pi \eta r_h} \quad (4) \quad \rightarrow \quad \frac{D_{\text{sample}}}{D_{\text{TMSS}}} = \frac{c(\text{TMSS}) f_s(\text{TMSS}) r_{\text{TMSS}}}{c(\text{sample}) f_s(\text{sample}) r_{\text{sample}}} \quad (5)$$

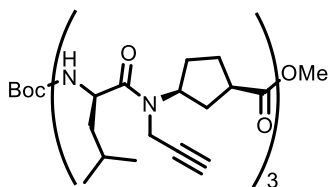
Chapter II

2.1. Synthesis and characterization



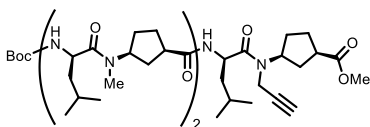
Boc-(D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₂-OMe (tet3). A solution of **dip3** (1.11 g, 2.83 mmol) in MeOH/H₂O (*V*_t = 20 mL, 4:1) was treated with LiOH (340 mg, 14.1 mmol) and stirred for 1 h. After this time, MeOH was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 2 (HCl 5% aq.) and extracted with CH₂Cl₂ (4x15 mL). The combined organic layers were dried with

anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give **Boc-D-Leu-^{prop}N-L-Acp-OH** as a white foam. Parallely, a different fraction of **dip3** (550 mg, 1.40 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and treated with TFA (4 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ and further evaporated, repeating this process up to three times. The free-acid fraction (533 mg, 1.40 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL) and subsequently DIEA (0.49 mL, 2.80 mmol) and *N*-HBTU (634 mg, 1.75 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL) and DIEA was added (0.98 mL, 5.60 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 2 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x15 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (25-50% AcOEt/hexane). To give the title compound as a foam. [897 mg, 97%, *R*_f = 0.30 (50% AcOEt/hexane)]. **MS (ESI)** [*m/z* (%): 657 (100), 476 (75), 679 (35)]. **HRMS (ESI)** Calculated for C₃₆H₅₇N₄O₇: 657.4222; found: 657.4222.



Boc-(D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₃-OMe (hex3). **Tet3** (692 mg, 1.05 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and treated with TFA (5 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ and further evaporated, repeating this process thrice. Free-acid

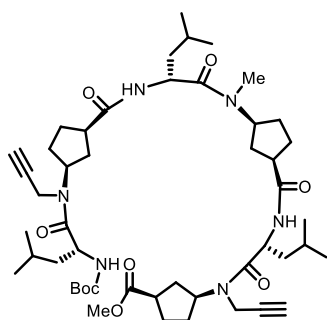
Boc-D-Leu-^{prop}N-L-Acp-OH obtained in the previous step was dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL) and then DIEA (0.37 mL, 2.10 mmol) and *N*-HBTU (478 mg, 1.26 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL) and DIEA was added (0.73 mL, 4.20 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 2 h. This solution was washed with HCl 5% (2x15 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x15 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4 % MeOH/CH₂Cl₂), to give the linear hexapeptide as a foam. [874 mg, 91%, *R*_f = 0.42 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **HRMS (ESI)** Calculated for C₅₁H₇₉N₆O₉: 919.5903; found: 919.5904.



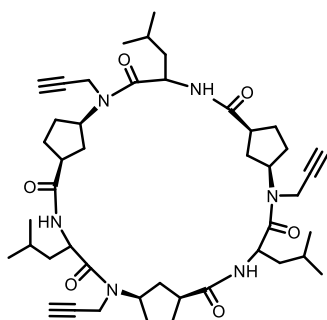
Boc-(D-Leu-^{Me}N-L-Acp)₂-D-Leu-^{prop}N-L-Acp-OMe (hex2,2,3). **Tet2,3** (90 mg, 0.13 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.3 mL) and treated with TFA (1.3 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the

resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ and further evaporated, repeating this process up to

three times. Free-acid **Boc-D-Leu^{Me}N-L-Acp-OH** (49 mg, 0.13 mmol) obtained previously was dissolved in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and subsequently DIEA (45 μ L, 0.26 mmol) and *N*-HBTU (61 mg, 0.16 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and DIEA was added (90 μ L, 0.52 mmol). Finally, both fractions were mixed and reacted under Ar for 2 h. This solution was washed with HCl 5% (2x5 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x5 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4 % MeOH/CH₂Cl₂), to give the linear hexapeptide as a foam. [95 mg, 81%, *R_f* = 0.42 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **MS (ESI)** [*m/z* (%): 894 ([100]), 871 (85), 420 (65)]. **HRMS (ESI)** Calculated for C₄₇H₇₈N₆NaO₉: 893.5722; found: 893.5730.

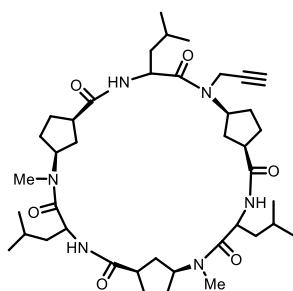


Boc-D-Leu^{prop}N-L-Acp-D-Leu^{Me}N-L-Acp-D-Leu^{prop}N-L-Acp-OMe (hex3,2,3). Tet2 (92 mg, 0.15 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1.3 mL) and treated with TFA (1.3 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ and further evaporated, repeating this process up to three times. Free-acid **Boc-D-Leu^{prop}N-L-Acp-OH** (55 mg, 0.15 mmol) obtained previously was dissolved in dry CH₂Cl₂ (3.5 mL) and subsequently DIEA (50 μ L, 0.28 mmol) and *N*-HBTU (65 mg, 0.17 mmol) were added. The TFA salt was dissolved in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and treated with DIEA (150 μ L, 0.52 mmol). Finally, both fractions were stirred together under Ar for 2 h. The resulting solution was washed with HCl 5% (2x5 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x5 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4 % MeOH/CH₂Cl₂), to give the linear hexapeptide as a foam. [105 mg, 80%, *R_f* = 0.37 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **MS (ESI)** [*m/z* (%): 918 (100), 896 (55), 420 (40)]. **HRMS (ESI)** Calculated for C₄₉H₇₈N₆NaO₉: 917.5722; found: 917.5717.

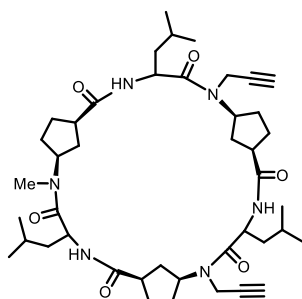


c-[(D-Leu^{prop}N-L-Acp)₃] (CP5). To a solution of **hex3** (804 mg, 0.876 mmol) in MeOH/H₂O (*V*_t = 8.7 mL, 3:1), LiOH (63.0 mg, 2.63 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 2 h. Then, the organic solvent was concentrated under reduced pressure and the remaining aqueous solution was acidified until pH 2 (HCl 5% aq.), extracted with CH₂Cl₂ (4x10 mL), dried with anh. Mg₂SO₄ and filtered. After solvent evaporation, the free acid was obtained as a white foam. This foam was further dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL) and treated with TFA (4 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH₂Cl₂ and successively evaporated (3x). This residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (876 mL; 2 mM) and then DIEA (0.92 mL, 5.26 mmol) and *N*-TBTU (338 mg, 1.05 mmol) were added. After 16 h of stirring under Ar, this solution was concentrated to i.e., one tenth of its initial volume and washed with HCl 5% (2x10 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x10 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated by rotary-evaporation. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-4 % MeOH/CH₂Cl₂). To give the desired cyclic peptide as a white solid. [341 mg, 49%, *R_f* = 0.35 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.11 (d, *J* = 9.5 Hz, 3 H), 5.10 (m, 3H), 4.80 (AB, *J* = 20.1 Hz, 3H), 4.66

(m, 3H), 3.82 (AB, $J = 20.1$ Hz, 3H), 2.86 (m, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.21 - 1.28 (m, 27H), 0.94-0.84 ppm (overlapped 2d, 18H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ): 175.7 (C), 173.6 (C), 80.2 (C), 72.4 (CH), 54.9 (CH), 47.2 (CH), 41.4 (CH), 41.4 (CH_2), 35.9 (CH_2), 32.7 (CH_2), 27.7 (CH_2), 27.5 (CH_2), 24.6 (CH), 23.3 (CH_3), 22.0 ppm (CH_3). FTIR (CaF_2): $\nu = 3301$ (amide A), 1665, 1620 (amide I), 1533 cm^{-1} (amide II). MS (ESI) [m/z (%): 809 (100), 787 (70). HRMS (ESI) Calculated for $\text{C}_{45}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_6$: 787.5117; found: 787.5116.

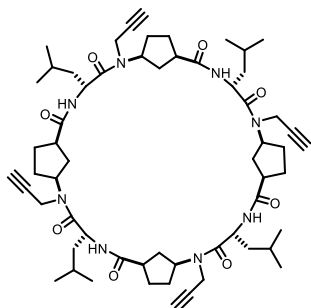


c-[(D-Leu-^{Me}N-L-Acp)₂-D-Leu-^{prop}N-L-Acp] (CP6). Hex2,2,3 (100 mg, 0.12 mmol) was dissolved in a MeOH/ H_2O mixture (3:1, $V_t = 2.3$ mL) and then LiOH (13 mg, 0.57 mmol) was added. The mixture was stirred for 1 h and, later, MeOH was evaporated under vacuum. The resulting aqueous layer was acidified until reaching pH 2, causing the precipitation of a white viscous product, which was extracted with CH_2Cl_2 (4x5 mL). The combined organic extracts were dried with anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting free-acid white film was dissolved in a mixture of CH_2Cl_2 /TFA (1:1, $V_t = 1.5$ mL) and stirred for 15 minutes, to be then rotary-evaporated in order to remove all traces of TFA. After deprotecting the N-terminus of the linear peptide, the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (108 mL) and treated with DIEA (110 μL , 0.65 mmol) and N-TBTU (52 mg, 0.16 mmol). The mixture was stirred overnight under Ar and after that time, the volume was reduced until 10 mL and washed with 5% HCl (2x10 mL) and saturated aqueous NaHCO_3 (2x10 mL). After drying with Mg_2SO_4 , filtering and concentrating, the crude was purified by SiO_2 flash column chromatography (1-10% MeOH/ CH_2Cl_2) to give the title compound as white solid. [35 mg, 42%, $R_f = 0.25$ (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.37 - 7.97 (m, 3H), 5.37 - 4.97 (m, 3H), 4.97 - 4.56 (m, 4H), 4.12 - 3.65 (m, 1H), 3.08 (s, 6H), 3.04 - 2.75 (m, 3H), 2.44 - 2.17 (s and m, 4H), 2.17 - 1.29 (m, 24H), 1.12 - 0.75 (m, 18H). FTIR (neat): $\nu = 3301$ (amide A), 1670, 1620 (amide I), 1531 cm^{-1} (amide II). HRMS (ESI) Calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_6$: 739.5117; found: 739.5112.



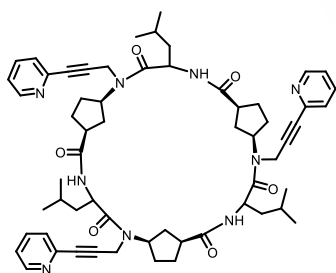
c-[(D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₂-D-Leu-^{Me}N-L-Acp] (CP7). To a solution of hex3,2,3 (105 mg, 0.12 mmol) in MeOH/ H_2O (3:1, $V_t = 2.4$ mL), LiOH (14.0 mg, 0.59 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 2 h. Then, the organic solvent was concentrated under reduced pressure and the resulting solution was acidified until pH 2 (HCl 5% aq.) and extracted with CH_2Cl_2 (4x10 mL), dried with anhydrous Mg_2SO_4 and filtered. After solvent evaporation, the free acid was obtained as a white foam. This foam was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL) and treated with TFA (1 mL). After stirring for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was redissolved in CH_2Cl_2 and successively evaporated (three repetitions in total). The TFA salt was dissolved in dry CH_2Cl_2 (117 mL) and then DIEA (120 μL , 0.7 mmol) and N-TBTU (56 mg, 0.18 mmol) were added. After 13 h stirring under Ar, this solution was concentrated up to 20 mL and washed with HCl 5% (2x10 mL) and sat. aq. NaHCO_3 (2x10 mL), dried with anhydrous Mg_2SO_4 , filtered and concentrated by rotary-evaporation. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-5% MeOH/ CH_2Cl_2) to give the desired cyclic peptide as a white solid. [43

mg, 48%, $R_f = 0.33$ (5% MeOH/CH₂Cl₂). **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.31 - 8.06 (m, 3H), 5.26 - 5.07 (m, 3H), 4.88 - 4.60 (m, 5H), 3.85 (2s, 2H), 3.07 (m, 3H), 2.89 (m, 3H), 2.27 (2s, 2H), 2.25 - 1.32 (m, 27H), 1.03 - 0.86 (m, 18H). **FTIR** (neat): $\nu = 3306$ (amide A), 1663, 1626 (amide I), 1531 cm⁻¹ (amide II). **MS (ESI)** [m/z (%): 763 (100), 785 (90). **HRMS (ESI)** Calculated for C₄₃H₆₇N₆O₆: 763.5117; found: 763.5103.



c-(D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₄ (CP11). Tet3 (210 mg, 0.32 mmol) was dissolved in MeOH (2.4 mL) and water (0.8 mL) and then LiOH (38 mg, 1.6 mmol) was added. After stirring for 2h, the organic solvent was evaporated, and the remaining aqueous layer was acidified until pH 2 with HCl. The resulting white precipitate was extracted with CH₂Cl₂ (4x5 mL), dried, filtered and concentrated. Free acid was further deprotected by a solution of TFA/CH₂Cl₂ (1:1, V_t = 3.5 mL), in which the product was stirred for 15 min. After completion of the reaction, TFA was removed using the typical protocol (*vide supra*).

For the cyclization step, the oil obtained in the previous step was dissolved in dry CH₂Cl₂ (85 mL) and treated with DIEA (170 μ L, 1 mmol) and *N*-TBTU (164 mg, 0.51 mmol). The mixture was stirred under Ar for 18 h and then washed with 5% HCl (2x15 mL) and sat. aq. NaHCO₃ (2x15 mL). The organic layer was dried with Mg₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by semipreparative HPLC (2-5% MeOH/CH₂Cl₂ in 30 min) to give the compound as white solid.⁴⁹² (22 mg, 13%, t_R = 8 minutes). **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.24 (d, $J = 9.5$ Hz, 4H), 5.24 - 5.10 (m, 4H), 4.78 - 4.58 (m, 8H), 3.89 (dd, $J = 19.3$, 2.0 Hz, 4H), 3.07 - 2.91 (m, 4H), 2.30 - 2.24 (m, 4H), 1.96 - 1.47 (m, 36H), 0.95 (d, $J = 6.2$ Hz, 24H). **FTIR (CaF₂)**: $\nu = 3307$ (amide A), 1628 (amide I), 1536 cm⁻¹ (amide II). **HRMS (ESI)** Calculated for C₆₀H₈₉N₈O₈: 1049.6798 763.5117; found: 1049.6810.

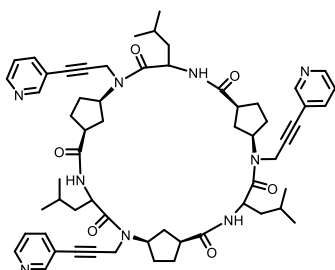


c-[(D-Leu-^{py-o}N-L-Acp)₃] (CP5a). CP5 (30.0 mg, 0.0382 mmol), 2-iodopyridine (37 μ L, 0.344 mmol) and CuI (2.2 mg, 1.15 · 10⁻³ mmol) were dissolved in a THF/Et₃N mixture (V_t = 3.8 mL, 4:1) and degassed for 15 min with a steady Ar bubbling. After this time, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (4.0 mg, 5.73 · 10⁻³ mmol) was added and the mixture was stirred under Ar for 12 h. The solvent was evaporated, and the resulting mixture was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with sat. aq. NH₄Cl (2 x 5 mL). The organic layer was dried over anh.

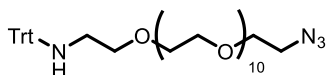
Mg₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (0-10% MeOH/CH₂Cl₂), which afforded the title compound as a slightly yellowish solid. [17.0 mg, 44%, $R_f = 0.27$ (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.58 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 8.26 (d, $J = 9.4$ Hz, 3H), 7.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 3H), 7.23 (t, $J = 5.0$ Hz, 3H), 5.28 (m, 3H), 5.13 (AB, $J = 19.0$ Hz, 3H), 4.79 (m, 3H), 4.12 (AB, $J = 19.0$ Hz, 3H), 2.95 (m, 3H), 2.36-1.32 (m, 27H), 1.02 - 0.78 ppm (m, 18H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 175.7 (CO), 173.9 (CO), 150.1 (CH), 142.7 (C), 136.1 (CH), 127.0 (CH), 123.0 (CH), 85.8 (C), 83.6 (C), 55.0 (CH), 47.6 (CH), 42.0

⁴⁹² The reaction also provided the compound **c-[(D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₂]** as main product (26%), which presented a R_f value similar to the octameric product, which made them very difficult to separate by regular flash column chromatography.

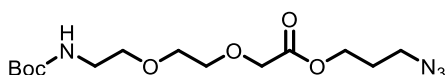
(CH), 41.6 (CH₂), 36.3 (CH₂), 33.6 (CH₂), 28.0 (CH₂), 27.8 (CH₂), 24.8 (CH), 23.4 (CH₃), 22.1 (CH₃) ppm. **FTIR** (CaF₂): ν = 3307 (amide A), 1665, 1627 (amide I), 1530 cm⁻¹ (amide II). **MS** (ESI) [m/z (%): 510 (100), 1040 (35). **HRMS** (ESI) calculated for C₆₀H₇₆N₉O₆: 1018.5913, found: 1018.5920.



c-[(D-Leu^{py-m}N-L-Acp)₃] (CP5b). CP5 (30.0 mg, 0.0382 mmol) was dissolved in a dry and degassed mixture of THF/Et₃N (V_t = 3.8 mL, 3:1), with 3-iodopyridine (70.5 mg, 0.344 mmol) and CuI (2.2 mg, 0.0115 mmol). Then, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (4.0 mg, 0.00573 mmol) was added and the resulting solution was stirred under Ar for 12 h. The solvent was evaporated, and the oily mixture was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with sat. aq. NH₄Cl (2 x 5 mL). The organic layer was dried over anhyd. MgSO₄, filtered and concentrated. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (0-10% MeOH/CH₂Cl₂), which afforded the title compound as a slightly greenish solid. [20.0 mg, 51%, R_f = 0.25 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.62 (br s, 3H), 8.54 (br d, 3H), 8.28 (d, J = 9.3 Hz, 3H), 7.67 (d, J = 7.7 Hz, 3H), 7.24 (t, J = 5.0 Hz, 3H), 5.26 (m, 3H), 5.18 (d, J = 18.7 Hz, 3H), 4.78 (m, 3H), 4.15 (d, J = 18.7 Hz, 3H), 2.99 (m, 3H), 2.37 - 1.43 (m, 27H), 0.97 - 0.86 ppm (2d, 18H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 176.0 (CO), 173.9 (CO), 152.2 (CH), 149.0 (CH), 138.5 (CH), 123.2 (CH), 119.7 (C), 89.2 (C), 80.9 (C), 55.2 (CH), 47.6 (CH), 41.8 (CH₂), 41.7 (CH), 36.1 (CH₂), 33.7 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 24.9 (CH), 23.4 (CH₃), 22.2 ppm (CH₃). **MS** (ESI) [m/z (%): 510 (100), 1040 (30). **FTIR** (CaF₂): ν = 3307 (amide A), 1665, 1627 (amide I), 1530 cm⁻¹ (amide II). **HRMS** (ESI) calculated for C₆₀H₇₆N₉O₆: 1018.5913, found: 1018.5920.



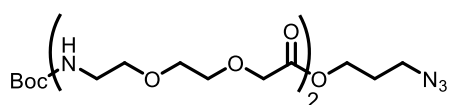
TrtHN-(CH₂CH₂O)₁₁-CH₂CH₂N₃ (10, Pendant "L"). A solution of commercially available H₂N-(CH₂CH₂O)₁₁-CH₂CH₂N₃ (55 mg, 0.10 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was treated with trityl chloride (56 mg, 0.19 mmol) and DIEA (33.4 μ L, 0.19 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Then, an aqueous saturated solution of NH₄Cl (1 mL) was added. The resulting emulsion was poured into a separation funnel and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 2 mL). The combined organic layers were dried over anhyd. Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (1-2% MeOH/CH₂Cl₂) to give **10** as yellow solid. Spectroscopic data agreed with the previously described values in the literature.²⁴⁶ [65 mg, 83%, R_f = 0.40 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.55 - 7.43 (m, 6H), 7.30 - 7.16 (m, 9H), 3.76 - 3.50 (m, 42H), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.36 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.08 (br, 2H).



Boc-O₂Oc-O^CN₃ (11). Boc-O₂Oc-OH⁴⁹³ (150 mg, 0.57 mmol) and **8** (84 mg, 0.84 mmol) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (7 mL) and treated, in this order, with: EDC·HCl

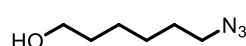
⁴⁹³ Boc-O₂Oc-OH was purchased as dicyclohexylammonium salt. Hence, prior to its use, a convenient amount was dissolved in AcOEt and washed with 5% aq. H₃PO₄ (2x) to obtain free acid form.

(165 mg, 0.86 mmol), HOBt (116 mg, 0.86 mmol) and DMAP (105 mg, 0.86 mmol). After 3h, the mixture was washed with 5% HCl (2x15 mL) and NaHCO₃ (2x10 mL). After drying, filtering and concentrating the sample, the crude compound was purified by flash chromatography (40% AcOEt/hexane) to afford the title compound. [84 mg, 42%, R_f = 0.25 (50% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.07 (br, 1H), 4.20 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.69 - 3.63 (m, 2H), 3.63 - 3.56 (m, 2H), 3.49 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.43 - 3.32 (m, 2H), 3.32 - 3.20 (m, 2H), 1.89 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.1 (C), 155.8 (C), 79.0 (C), 70.7 (CH₂), 70.1 (CH₂), 70.0 (CH₂), 68.3 (CH₂), 61.6 (CH₂), 59.3 (CH₂), 47.8 (CH₂), 40.1 (CH₂), 28.2 (CH₃). HRMS (ESI) calculated for C₁₄H₂₆N₄O₆: 346.1852, found: 346.1854.

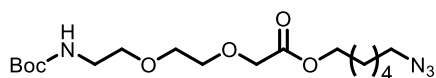


Boc-(O₂Oc)₂-O-C³N₃ (12, Pendant "S"). Boc-O₂Oc-O-C³N₃ (84 mg, 0.24 mmol), was treated with a mixture of TFA (1.6 mL) and CH₂Cl₂ (3.2 mL) for 30 minutes. Then, the solvent was evaporated, diluted with additional

CH₂Cl₂ and concentrated again, repeating this process up to three times. After the final evaporation, the sample was placed under high vacuum for 3 h. After this time, the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.5 mL). Then, under Ar, this solution was mixed with a different solution containing Boc-O₂Oc-OH (76 mg, 0.29 mmol), *N*-HBTU (136 mg, 0.36 mmol) and DIEA (250 μ L, 1.44 mmol) and stirred for 2 h. The resulting mixture was washed with 5% HCl (2x10 mL) and NaHCO₃ (2x10 mL). After drying with anh. Mg₂SO₄, filtering and concentrating, the crude was purified by flash chromatography (0-3% MeOH/ CH₂Cl₂) to afford the title compound. [66 mg, 55%, R_f = 0.34 (5% MeOH/ CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.25 (br, 1H), 5.20 (br, 1H), 4.23 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.75 - 3.45 (m, 12H), 3.39 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.35 - 3.26 (m, 4H), 1.92 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.2 (C), 170.0 (C), 159.3 (C), 79.2 (C), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.2 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.7 (CH₂), 68.4 (CH₂), 66.3 (CH₂), 61.7 (CH₂), 48.1 (CH₂), 40.4 (CH₂), 38.6 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.1 (CH₃). HRMS (ESI) calculated for C₂₀H₃₈N₅O₉: 492.2664, found: 492.2660.



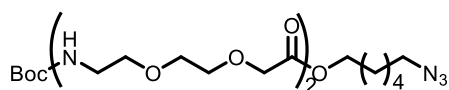
6-azidohexan-1-ol (13).⁴⁹⁴ 6-bromohexan-1-ol (1.030 g, 5.7 mmol) was dissolved in an EtOH/H₂O mixture (1:1, V_t = 23 mL) and then NaN₃ (1.110 g, 17.1 mmol) was added. After stirring at 80 °C for 48h, EtOH was concentrated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (20 mL) and the organic phase washed with brine (2x15 mL). The organic layer was dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated to afford the desired product as transparent oil. [741 mg, 91%, R_f = 0.8 (50% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 3.52 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.19 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.79 (s, 1H), 1.63 - 1.40 (m, 4H), 1.40 - 1.23 (m, 4H).



Boc-O₂Oc-O-C⁶N₃ (14). Boc-O₂Oc-OH (100 mg, 0.38 mmol) and **13** (77 mg, 0.54 mmol) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and treated, in this order, with: EDC·HCl

⁴⁹⁴P. Zhang, K. Ng, C.-C. Ling, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 128-136.

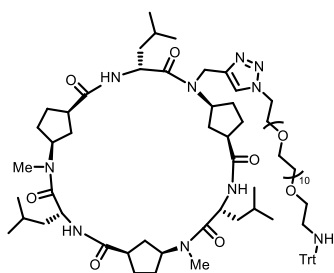
(104 mg, 0.54 mmol), HOBt (73 mg, 0.54 mmol) and DMAP (66 mg, 0.54 mmol). After 1.5h, the mixture was washed with 5% HCl (2x10 mL) and NaHCO₃ (2x10 mL). After drying, filtering and concentrating, the crude compound was purified by flash chromatography (40% AcOEt/Hexane) to afford the title compound. [100 mg, 77%, R_f = 0.75 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.10 (s, 1H), 4.15 - 4.04 (m, 4H), 3.73 - 3.63 (m, 2H), 3.63 - 3.53 (m, 4H), 3.48 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.23 (dt, J = 13.7, 6.1 Hz, 7H), 1.70 - 1.45 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.36 - 1.26 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.4 (C), 156.0 (C), 79.1 (C), 70.8 (CH₂), 70.2 (CH₂), 68.5 (CH₂), 64.6 (CH₂), 62.5 (CH₂), 51.2 (CH₂), 40.3 (CH₂), 32.5 (CH₂), 28.6 (CH₂), 28.3 (CH₃), 26.2 (CH₂), 25.4 (CH₂). HRMS (ESI) calculated for C₁₇H₃₂N₄NaO₆: 411.2210, found: 411.2220.



Boc-(O₂Oc)₂-O^C₆N₃ (15, Pendant "I"). **14** (100 mg, 0.26 mmol), was treated with a mixture of TFA (0.5 mL) and CH₂Cl₂ (2 mL) for 15 min. Then, the solvent was

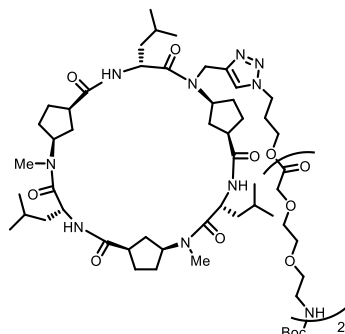
evaporated, diluted with additional CH₂Cl₂ and concentrated again, repeating this process three times. The residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.5 mL). Then, under Ar, this solution was mixed with a different solution CH₂Cl₂ (3 mL) containing Boc-O₂Oc-OH (81 mg, 0.31 mmol), *N*-HBTU (147 mg, 0.39 mmol) and DIEA (265 μ L, 1.54 mmol) and stirred for 3 h. The resulting mixture was washed with 5% HCl (2x10 mL) and NaHCO₃ (2x10 mL). After drying with anhyd. MgSO₄, filtering and concentrating, the crude was purified by column chromatography (0-2% MeOH/ CH₂Cl₂) to afford the title compound. [87 mg, 64%, R_f = 0.41 (5% MeOH/ CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.27 - 7.21 (m, 1H), 5.24 (br, 1H), 4.12 - 4.04 (m, 4H), 3.93 (s, 2H), 3.68 - 3.40 (m, 14H), 3.29 - 3.16 (m, 4H), 1.65 - 1.48 (m, 4H), 1.39 - 1.35 (m, 9H), 1.35 - 1.28 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.4 (C), 170.2 (C), 156.0 (C), 79.2 (C), 70.9 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.3 (CH₂), 70.1 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 68.7 (CH₂), 68.4 (CH₂), 64.6 (CH₂), 51.2 (CH₂), 40.3 (CH₂), 38.6 (CH₂), 28.6 (CH₂), 28.4 (CH₃), 26.2 (CH₂), 25.4 (CH₂). HRMS (ESI) calculated for C₂₃H₄₃N₅NaO₉: 556.2953, found: 556.2954.

General procedure for click chemistry attachment of azide-containing pendants and alkyne-CPs: Alkyne CP and azide-containing pendant (1.1 equiv per alkyne position) were dissolved in dry and degassed (15 min, Ar bubbling) CH₂Cl₂ (2 mM) and then stocks solutions of DIEA (0.29 M, 300%mol), TBTA (5 mM, 5%mol) and [Cu(MeCN)₄PF₆] (12 mM, 10%mol *per click*) were added. The mixture was stirred under Ar overnight and then washed with saturated aqueous NH₄Cl (2x5 mL), dried with anhyd. MgSO₄, filtered and purified by column chromatography (short SiO₂ pads because of the high retention of the compounds).

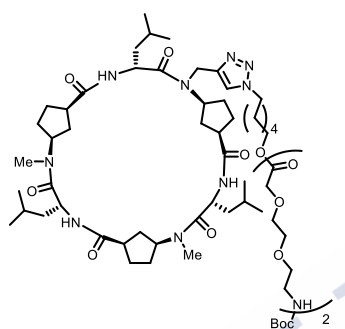


(Trt)-CP6L. This compound was prepared from **CP6** (6.3 mg, 8.5 · 10⁻³ mmol) and **10** using the protocol above. (transparent film, 14 mg, 96%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.43 - 8.19 (m, 3H), 7.67 (s, 1H), 7.53 - 7.43 (m, 6H), 7.37 - 7.14 (m, 10H), 5.27 - 5.11 (m, 3H), 5.11 - 4.95 (m, 1H), 4.95 - 4.72 (m, 3H), 4.57 - 4.35 (m, 3H), 3.94 - 3.47 (m, 44H), 3.16 - 2.87 (m, 9H), 2.49 - 1.18 (m, 29H), 0.93 (s, 14H), 0.80 - 0.70 (m, 2H), 0.65 - 0.54 (m, 2H). FTIR

(neat): $\nu = 3295$ (amide A), 1663, 1617 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{84}\text{H}_{131}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$: 1551.9688, found: 1551.9698.

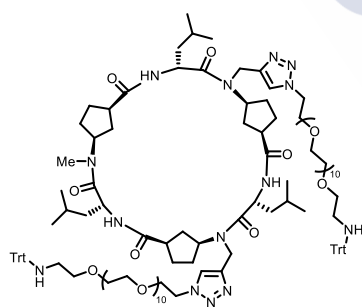


(Boc)-CP6S. This compound was prepared from **CP6** (8.0 mg, $11 \cdot 10^{-3}$ mmol) and **12** using the protocol above. (transparent oil, 9.4 mg, 70%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.48 - 8.14 (m, 3H), 7.59 (s, 1H), 5.27 - 5.08 (m, 3H), 5.08 - 4.70 (m, 4H), 4.52 - 4.31 (m, 3H), 4.18 (m, 4H), 4.00 (s, 2H), 3.86 - 3.40 (m, 14H), 3.40 - 3.24 (m, 2H), 3.09 (s, 6H), 3.04 - 2.82 (m, 3H), 2.52 - 1.50 (m, 29H), 1.44 (s, 9H), 0.93 (s, 14H), 0.82 - 0.67 (m, 2H), 0.67 - 0.52 (m, 2H). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{61}\text{H}_{103}\text{N}_{11}\text{NaO}_{15}$: 1252.7527, found: 1252.7534.

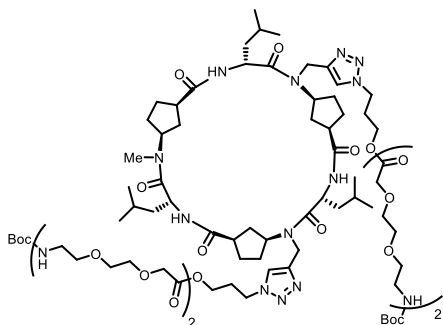


(Boc)-CP6I. **CP6** (3.5 mg, $4.1 \cdot 10^{-3}$ mmol) and **15** were clicked by means of the general protocol to provide the desired molecule. (oil, 3.6 mg, 70%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.40 - 8.20 (m, 3H), 7.54 (s, 1H), 5.29 - 5.10 (m, 3H), 5.10 - 4.94 (m, 1H), 4.94 - 4.75 (m, 3H), 4.47 - 4.26 (m, 3H), 4.19 - 4.07 (m, 4H), 4.07 - 3.94 (m, 2H), 3.76 - 3.46 (m, 14H), 3.42 - 3.27 (m, 2H), 3.10 (s, 6H), 3.06 - 2.87 (m, 3H), 2.50 - 1.33 (m, 37H), 1.33 - 1.20 (m, 9H), 1.00 - 0.84 (m, 14H), 0.75 (m, 2H), 0.69 - 0.53 (m, 2H). **FTIR (neat)**: $\nu = 3291$ (amide A), 1753, 1706, 1663, 1617 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II).

HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{64}\text{H}_{110}\text{N}_{11}\text{O}_{15}$ 1272.8177, found: 1272.8176.



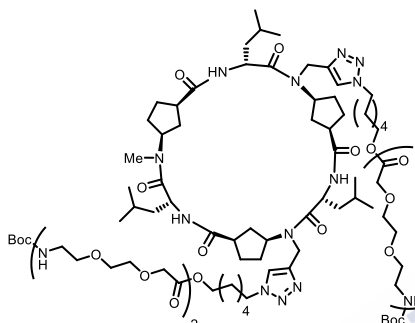
(Trt)-CP7L. **CP7** (8.1 mg, $10.3 \cdot 10^{-3}$ mmol) and pendant **10** were attached following the typical procedure. (transparent oil, 15.0 mg, 86%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.42 - 8.21 (m, 3H), 7.65 (2s, 2H), 7.49 - 7.42 (m, 10H), 7.30 - 7.11 (m, 20H), 5.40 - 5.12 (m, 3H), 5.12 - 4.95 (m, 2H), 4.95 - 4.72 (m, 3H), 4.60 - 4.38 (m, 6H), 3.93 - 3.34 (m, 88H), 3.15 - 2.92 (m, 6H), 2.54 - 1.16 (m, 31H), 0.90 (m, 6H), 0.80 - 0.68 (m, 6H), 0.64 - 0.53 (m, 6H). **FTIR (neat)**: $\nu = 3299$ (amide A), 1635, 1628 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{91}\text{H}_{167}\text{N}_{14}\text{O}_{28}$: 1904.2069, found: 1904.2077 (loss of trityl protecting groups).



(amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{83}\text{H}_{140}\text{N}_{16}\text{NaO}_{24}$: 1768.0119, found: 1768.0112.

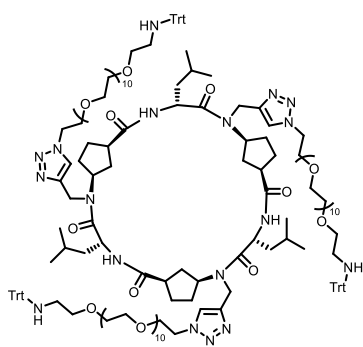
(Boc)-CP7S. CP7 (8.0 mg, $10 \cdot 10^{-3}$ mmol) and pendant **12** were reacted following the protocol described above. (transparent oil, 16.4 mg, 80%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.47 - 8.22 (m, 3H), 7.60 (2s, 2H), 7.26 (br, 2H), 5.40 - 5.12 (m, 3H), 5.12 - 4.75 (m, 5H), 4.56 - 4.36 (m, 6H), 4.30 - 4.11 (m, 8H), 4.00 (s, 4H), 3.87 - 3.45 (m, 28H), 3.41 - 3.25 (m, 4H), 3.09 (m, 6H), 2.55 - 1.16 (m, 36H), 0.92 (s, 18H), 0.73 (s, 9H), 0.68 - 0.52 (m, 4H).

FTIR (neat): ν = 3291 (amide A), 1753, 1706, 1663, 1617



1664, 1626 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{79}\text{H}_{138}\text{N}_{16}\text{O}_{20}$: 8155131, found: 815.5141 (half peak of free diamino compound).

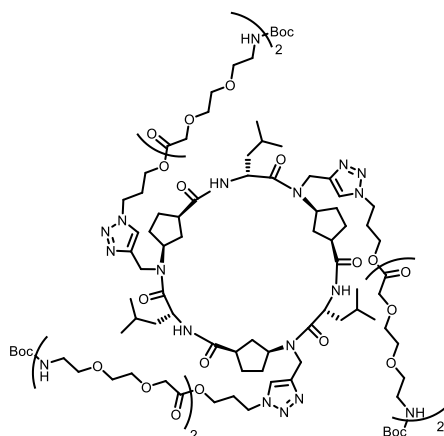
(Boc)-CP7I. CP7 (7.0 mg, $9.2 \cdot 10^{-3}$ mmol) was clicked to azide **15** by means of standard conditions. (transparent film, 14.9 mg, 89%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.45 - 8.24 (m, 3H), 7.52 (2s, 2H), 7.26 - 7.22 (m, 2H), 5.40 - 5.13 (m, 5H), 5.08 - 4.73 (m, 5H), 4.48 - 4.37 (m, 2H), 4.37 - 4.24 (m, 4H), 4.18 - 4.07 (m, 8H), 3.99 (s, 4H), 3.75 - 3.45 (m, 28H), 3.39 - 3.25 (m, 4H), 3.15 - 2.87 (m, 6H), 2.51 - 2.18 (m, 8H), 2.14 - 1.18 (m, 53H), 0.98 - 0.50 (m, 18H). **FTIR (neat):** ν = 3295 (amide A), 1748, 1706,



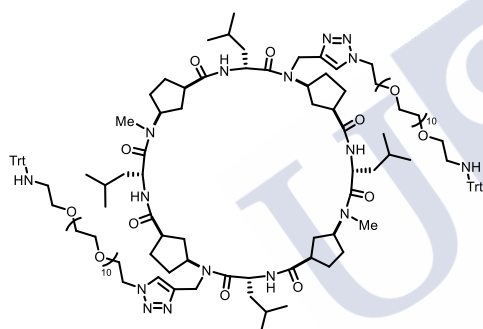
71.2 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.1 (CH_2), 69.5 (CH_2), 55.3 (CH), 50.2 (CH_2), 47.5 (CH), 43.0 (CH_2), 41.4 (CH), 41.2 (CH_2), 38.8 (CH_2), 36.0 (CH_2), 29.7 (CH_2), 28.5 (CH_2), 27.7 (CH_2), 24.4 (CH), 23.4 (CH_3), 21.5 (CH). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{117}\text{H}_{217}\text{N}_{18}\text{O}_{39}$: 2498.5545, found: 2498.5554 (loss of trityl protecting groups).

(Trt)-CP5L. CP5 (8.1 mg, $10.3 \cdot 10^{-3}$ mmol) and pendant **10** were attached following the typical procedure. (oil, 23.5 mg, 71%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.35 (d, J = 8.9 Hz, 3H), 7.65 (s, 3H), 7.49 - 7.42 (m, 15H), 7.30 - 7.12 (m, 30H), 5.35 (d, J = 16.4 Hz, 3H), 5.11 - 4.97 (m, 3H), 4.97 - 4.81 (m, 3H), 4.61 - 4.42 (m, 9H), 3.85 (t, J = 5.3 Hz, 6H), 3.79 - 3.55 (m, 120H), 3.55 - 3.45 (m, 6H), 3.15 - 2.95 (m, 3H), 2.51 - 1.19 (m, 33H), 0.74 (d, J = 6.6 Hz, 9H), 0.57 (d, J = 6.4 Hz, 9H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ):⁴⁹⁵ 176.4 (C), 174.3 (C), 146.1 (C), 145.3 (C), 128.7 (CH), 127.8 (CH), 126.2 (CH), 121.9 (CH), 77.2 (C),

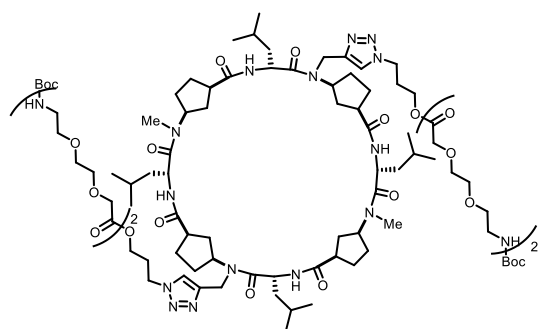
⁴⁹⁵ The mismatch between the total number of non-equivalent carbon signals in the molecule and the observed experimentally is produced by the overlap on the oligoethyleneglycol region.



(Boc)-CP5S. CP5 (12.0 mg, $15 \cdot 10^{-3}$ mmol) and pendant **12** were reacted following the general procedure. (film, 32.2 mg, 95%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 3H), 7.59 (s, 3H), 7.25 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 5.41 - 5.12 (m, 6H), 4.98 (m, 3H), 4.87 (m, 3H), 4.54 - 4.34 (m, 9H), 4.26 - 4.07 (m, 12H), 3.98 (s, 6H), 3.78 - 3.37 (m, 42H), 3.37 - 3.20 (m, 6H), 3.03 (m, 3H), 2.50-1.13 (m, 60H), 0.72 (d, $J = 6.2$ Hz, 9H), 0.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ):⁴⁹⁵ 176.5 (C), 174.2 (C), 170.1 (C), 170.0 (C), 156.0 (C), 145.6 (C), 121.2 (CH), 79.2 (C), 70.9 (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.1 (CH_2), 70.0 (CH_2), 68.3 (CH_2), 61.2 (CH_2), 55.4 (CH), 47.6 (CH), 47.0 (CH_2), 41.3 (CH), 40.4 (CH_2), 38.6 (CH_2), 36.0 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.6 (CH_2), 28.4 (CH_3), 27.6 (CH_2), 24.4 (CH), 23.3 (CH_3), 21.5 (CH_3). **FTIR** (neat): $\nu = 3299$ (amide A), 1630, 1626 (amide I), 1536 cm^{-1} (amide II). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{105}\text{H}_{177}\text{N}_{21}\text{NaO}_{33}$: 2283.27010, found: 2283.2708.

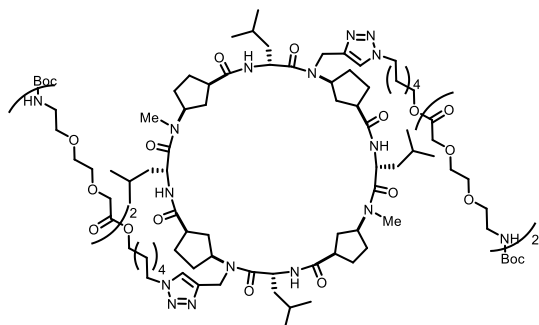


(Trt)-CP2L. CP2 (7.0 mg, $7 \cdot 10^{-3}$ mmol) was coupled with **10** via the general procedure described above. (yellowy oil, 13.4 mg, 73%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.55 - 8.29 (m, 4H), 7.68 - 7.61 (m, 2H), 7.55 - 7.41 (m, 10H), 7.37 - 7.11 (m, 20H), 5.36 - 5.08 (m, 6H), 5.08 - 4.62 (m, 6H), 4.61 - 4.35 (m, 6H), 3.91 - 3.47 (m, 88H), 3.17 - 2.85 (m, 10H), 2.42 - 2.24 (m, 8H), 2.16 - 1.14 (m, 32H), 1.04 - 0.48 (m, 24H). **FTIR** (neat): $\nu = 3359$, 3307 (amide A), 1638 (amide II), 1632 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS** (ESI) calculated for $\text{C}_{142}\text{H}_{216}\text{N}_{16}\text{Na}_2\text{O}_{30}$: 1335.7826, found: 1335.7819 (half peak).



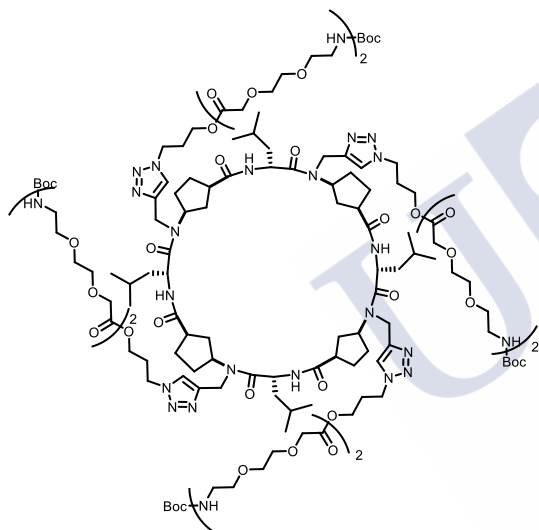
(Boc)-CP2S. CP2 (10.0 mg, $10 \cdot 10^{-3}$ mmol) was coupled with **12** following the general protocol. (18.5 mg, 93%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.52 - 8.29 (m, 4H), 7.61 (2s, 2H), 7.31 - 7.26 (m, 2H), 5.37 - 5.06 (m, 6H), 5.06 - 4.66 (m, 6H), 4.51 - 4.36 (m, 6H), 4.18 (t&s, 8H), 4.00 (s, 4H), 3.77 - 3.43 (m, 28H), 3.39 - 3.25 (m, 4H), 3.15 - 2.89 (m, 10H), 2.34 - 1.17 (m, 58H), 0.99 - 0.53 (m, 24H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ):⁴⁹⁵ 176.2 (C), 174.5 (C), 174.4 (C), 173.3 (C), 170.1 (C), 170.0 (C), 156.0 (C), 145.3 (C), 121.2 (CH), 79.2 (C), 70.9 (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.2 (CH_2), 70.0 (CH_2), 68.3 (CH_2), 61.2 (CH_2), 55.6 (CH), 54.6 (CH), 47.5 (CH), 46.9 (CH_2), 47.8 (CH), 43.2 (CH_2), 42.2 (CH), 41.9 (CH_2), 40.4 (CH_2), 38.6 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH), 28.7 (CH_2), 28.4 (CH_3), 24.7 (CH_3), 24.4 (CH), 24.3 (CH), 23.4 (CH_3), 22.1 (CH_3), 21.3 (CH_3). **FTIR** (neat): $\nu = 3307$

(amide A), 1748, 1702, 1664, 1626 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{96}\text{H}_{163}\text{N}_{18}\text{O}_{26}$: 1984.1980, found: 1984.1982.



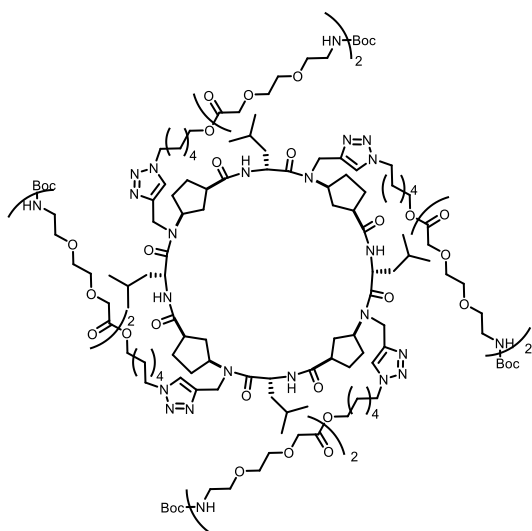
(Boc)-CP2I. CP2 (8.0 mg, $8 \cdot 10^{-3}$ mmol) and **15** were reacted as usual to give the title compound as transparent oil. (14.3 mg, 86%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.56 - 8.29 (m, 4H), 7.66 (s, 2H), 7.46 (d, $J = 7.6$ Hz, 11H), 7.35 - 7.11 (m, 21H), 5.36 - 5.08 (m, 4H), 5.08 - 4.65 (m, 6H), 4.59 - 4.34 (m, 6H), 3.98 - 3.24 (m, 88H), 3.21 - 2.87 (m, 10H), 2.45 - 2.24 (m, 8H), 2.19 - 1.18 (m, 32H), 1.08 - 0.84 (m, 12H), 0.84 - 0.69 (m, 6H), 0.69 -

0.50 (m, 6H). **FTIR (neat)**: $\nu = 3303$ (amide A), 1744, 1702, 1668, 1628 (amide I), 1532 cm^{-1} (amide II). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{92}\text{H}_{160}\text{N}_{18}\text{O}_{22}$: 934.5972, found: 934.5970 (half peak).



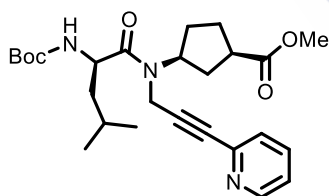
(Boc)-CP11S. CP11 (10.0 mg, $10 \cdot 10^{-3}$ mmol) and **12** were clicked by means of the protocol. (17.2 mg, 57%). **^1H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.43 - 8.32 (m, 4H), 7.68 (s, 4H), 7.30 - 7.26 (m, 4H), 5.35 - 5.09 (m, 8H), 5.09 - 4.92 (m, 4H), 4.86 - 4.70 (m, 4H), 4.53 - 4.36 (m, 12H), 4.25 - 4.09 (m, 16H), 3.99 (s, 8H), 3.77 - 3.45 (m, 56H), 3.31 (m, 8H), 3.18 - 2.94 (m, 4H), 2.38 - 1.19 (m, 80H), 0.77 (d, $J = 6.4$ Hz, 12H), 0.67 - 0.54 (m, 12H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ):⁴⁹⁵ 175.5 (C), 174.5 (C), 170.2 (C), 170.0 (C), 156.0 (C), 145.1 (C), 121.3 (CH), 79.2 (C), 70.9 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.2 (CH₂), 70.0 (CH₂), 68.3 (CH₂), 61.2 (CH₂), 55.7 (CH), 47.5 (CH), 47.0 (CH₂), 42.0 (CH₂), 41.3 (CH), 40.4 (CH₂), 38.6

(CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 28.4 (CH₃), 24.4 (CH), 23.4 (CH₃), 21.3 (CH₃). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{140}\text{H}_{236}\text{N}_{28}\text{Na}_2\text{O}_{44}$: 1530.3437, found: 1530.3432.

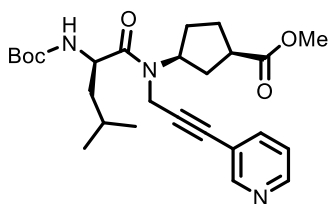


(Boc)-CP11I. CP11 (9.0 mg, $8.5 \cdot 10^{-3}$ mmol) and **15** were clicked by means of the protocol. (14 mg, 52%). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{152}H_{260}N_{28}Na_2O_{44}$: 1613.9376, found: 1613.9377.

General procedure for terminal amine deprotection (Boc and Trt protecting groups cleavage) of click derivatives PEG-CPs. A solution of the corresponding substrate in a mixture of TFA and CH_2Cl_2 (1:1, 0.05M) was stirred for 30 min at r.t., followed by solvent evaporation *via* the typical TFA removal protocol (*vide supra*). Protonated primary-amine products were dissolved in the appropriate amount of DMSO without further treatment and their transporting properties were tested by means of fluorescence transport assays described later in this manuscript (Section 2.2).

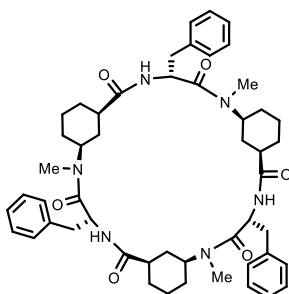


Boc-(D-Leu-*py-o*-N-L-Acp)-OMe (dip3a). dip3 (40.0 mg, 0.1 mmol), 2-iodopyridine (32 μ L, 0.3 mmol) and CuI (3.0 mg, 0.015 mmol) were dissolved in a THF/ Et_3N mixture ($V_t = 5$ mL, 4:1) and degassed for 15 min with Ar flow. After this time, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (4.0 mg, $5.73 \cdot 10^{-3}$ mmol) was added and the mixture was stirred under Ar for 12 h at 50 $^{\circ}C$. The solvent was evaporated, and the resulting mixture was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) and washed with sat. aq. NH_4Cl (2 x 5 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (25-100% AcOEt/hexane), which afforded the title compound as transparent oil. [41.4 mg, 87%, $R_f = 0.27$ (50% AcOEt/hexane)]. **1H NMR** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 8.62 - 8.51 (m, 1H), 7.74 - 7.59 (m, 1H), 7.52 - 7.36 (m, 1H), 7.32 - 7.17 (m, 1H), 5.39 - 5.27 (m, 0.5H), 5.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 0.5H), 5.00 - 4.63 (m, 2H), 4.48 - 4.14 (m, 2H), 3.78 - 3.63 (m, 3H), 2.94 - 2.77 (m, 1H), 2.39 - 1.53 (m, 9H), 1.53 - 1.37 (m, 9H), 1.10 - 0.84 (m, 6H). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 75.4 MHz, δ): 176.3 and 175.8 (CO), 174.0 and 172.59 (CO), 149.92 and 149.58 (CH), 136.19 (CH), 132.2 and 132.0 (C), 127.4 and 127.3 (CH), 123.1 and 122.9 (CH), 86.6 (C), 83.6 (C), 79.6 (C), 57.8 and 55.2 (CH), 52.0 and 51.91 (CH₃), 49.6 and 48.9 (CH), 43.4 and 42.5 (CH₂), 41.2 (CH₃), 33.61 and 32.87 (CH₂), 31.96 and 31.58 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.3 (CH₃), 27.68 and 27.34 (CH₂), 3.51 and 23.42 (CH), 22.02 and 21.61 (CH). **HRMS (ESI)** calculated for $C_{26}H_{37}N_3O_5Na$: 494.2625, found: 494.2621.



Boc-(D-Leu-*py-m*N-L-Acp)-OMe (dip3b). **dip3** (40.0 mg, 0.1 mmol), 3-iodopyridine (61 mg, 0.3 mmol) and CuI (3.0 mg, 0.015 mmol) were dissolved in a THF/Et₃N mixture ($V_t = 5$ mL, 4:1) and degassed for 15 min with an Ar flow. After this time, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (4.0 mg, $5.73 \cdot 10^{-3}$ mmol) was added and the mixture was stirred under Ar for 12 h at 50 °C. The solvent was evaporated, and the

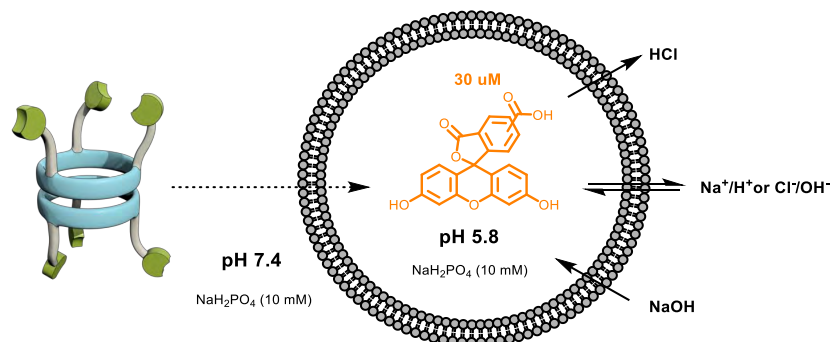
resulting mixture was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and washed with sat. aq. NH₄Cl (2 x 5 ml). The organic layer was dried over anhyd. MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Finally, the crude mixture was purified by flash column chromatography (25-100% AcOEt/hexane), which afforded the title compound as an oil. [43.2 mg, 90%, $R_f = 0.51$ (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.70 - 8.57 (m, 1H), 8.55 - 8.41 (m, 1H), 7.77 - 7.64 (m, 1H), 7.23 (m, 1H), 5.29 (d, $J = 9.1$ Hz, 0.5H), 5.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 0.5H), 4.95 - 4.60 (m, 2H), 4.44 - 4.12 (m, 2H), 3.73 - 3.64 (m, 3H), 2.92 - 2.76 (m, 1H), 2.30 - 1.44 (m, 9H), 1.43 - 1.38 (m, 9H), 0.93 (m, 6H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 176.5 and 175.9 (CO), 174.0 and 172.6 (CO), 155.6 (C), 152.1 (CH), 148.8 and 148.3 (CH), 138.9 (CH), 123.0 (CH), 89.7 and 89.0 (C), 81.0 (C), 79.6 (C), 57.8 and 55.0 (CH), 52.1 and 51.9 (CH), 49.5 and 48.9 (CH), 43.2 and 42.7 (CH₂), 41.2 (CH₃), 33.6 and 32.8 (CH₂), 31.9 and 31.6 (CH₂), 29.1 and 28.3 (CH₂), 28.1 (CH₃), 27.7 and 27.4 (CH₂), 24.7 (CH), 23.5 and 23.4 (CH), 22.1 and 21.7 (CH). **HRMS (ESI)** calculated for C₂₆H₃₇N₃O₅Na: 494.2625, found: 494.2622.



c-[(D-Phe-*Me*N-L-Ach)₃] (CP8). This compound was prepared following a previously described protocol in our group.²³⁵ **¹H NMR** (THF d_8 , 500 MHz) δ 8.59 (d, $J = 9.4$ Hz, 3H), 7.24 - 7.07 (m, 15H), 5.39 (m, 3H), 4.55 (m, 3H), 3.17 (m, 3H), 3.05 - 2.91 (m, 6H), 2.57 (s, 9H), 1.84 - 1.09 (m, 24H).

2.2 . Fluorescence assays

2.2.1 CF assay for pH gradient dissipation



Vesicles were prepared by slowly evaporating 1 mL of an EYPC (Avanti Polar Lipids) CHCl₃ solution (25 mg/mL) in a 10 mL round bottom flask, to give a thin film that was dried at high vacuum overnight. The film was hydrated with 1 mL of an aqueous solution containing CF (30 μM) in a NaH₂PO₄ buffer (10 mM, pH 5.8). The resulting mixture was subjected to tumbling (rotation) for an hour and after that time 9 freeze-thaw cycles (N₂(l) → 40 °C water bath) were carried out. The resulting suspension was extruded 15 times across a 100 nm polycarbonate membrane and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25) using as eluent NaH₂PO₄ buffer (10 mM, pH 5.8). The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL (approximate lipid concentration 6.6 mM).

Measurement protocol: 200 μL of the vesicle suspension were taken into a plastic cuvette containing 1800 μL of NaH₂PO₄ buffer (10 mM, pH 7.4). At t = 70 s, the compound under study (20 μL DMSO solution) was added and the change in CF fluorescence (basification) was measured (λ_{exc} = 493 nm and λ_{em} = 510 nm). At t = 400 s, Triton-X 100 (50 μL, 10% solution in water) was added to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at t = 500 s.

The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (11)$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence value at a certain time, F₀ is the fluorescence value before the addition of the compound under study (i.e., 50 s) and F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 450 s).

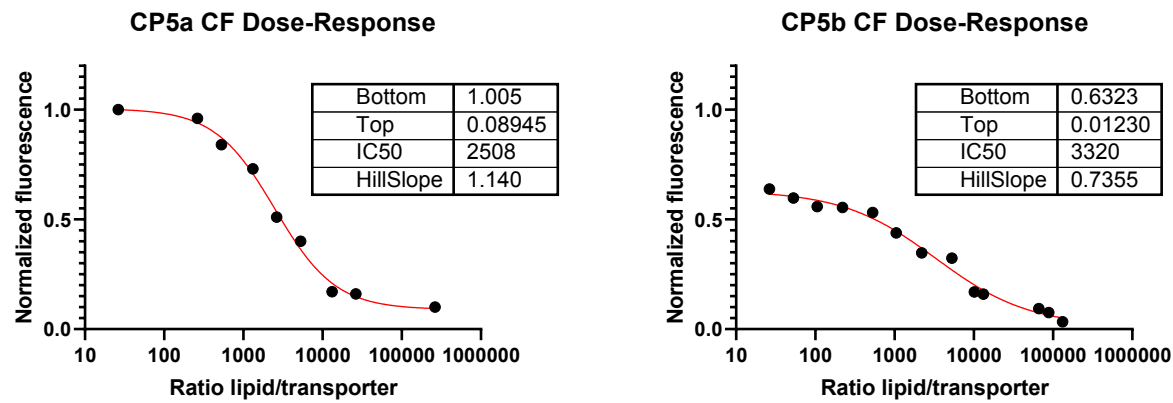


Figure 4. Hill curves of CF in LUVs presented as transporter:lipid ratio.

2.2.1.1 DLS characterization of CF in LUVs

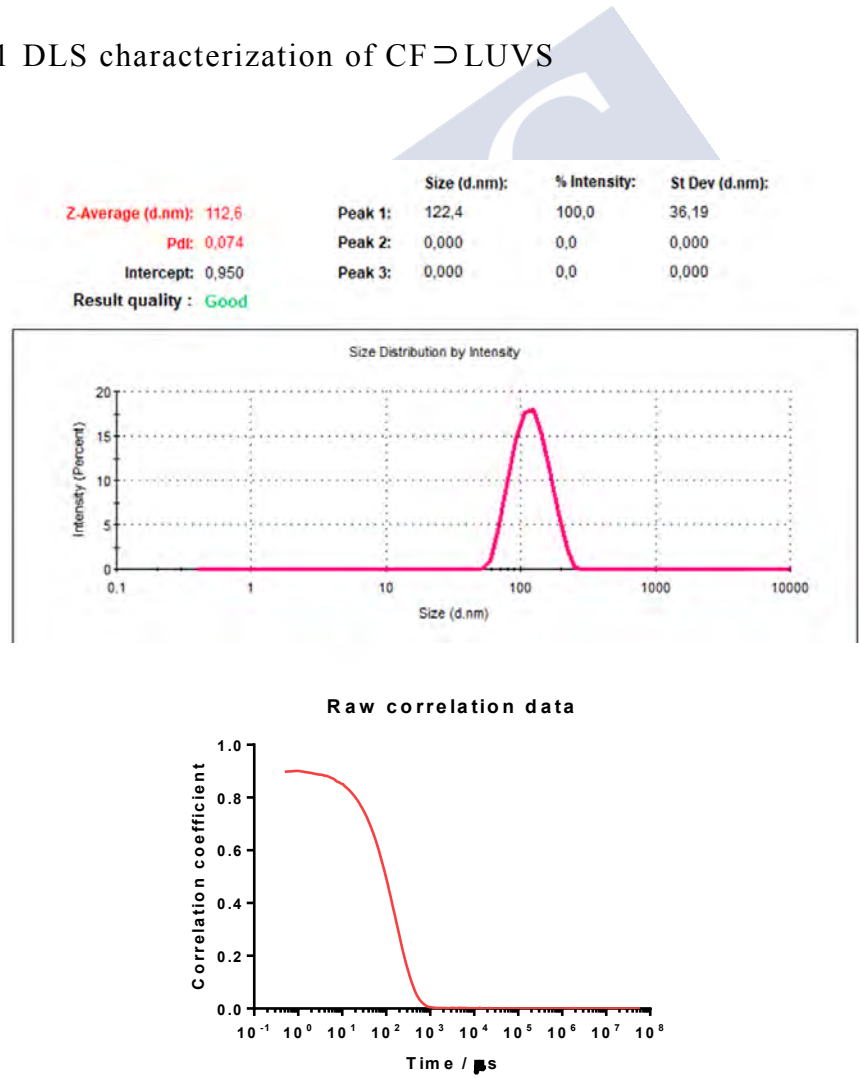
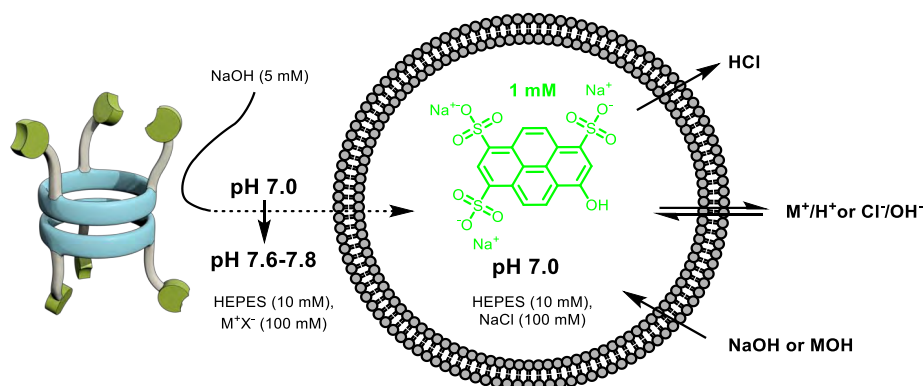


Figure 5. Dynamic Light Scattering analysis of freshly prepared 100 nm vesicles loaded with CF.

2.2.2 HPTS assay for pH dissipation and M⁺/X⁻ selectivity

Vesicles were prepared by taking 1 mL of a EYPC (Avanti Polar Lipids) CHCl₃ solution (25 mg/mL) into a 10 mL round bottom flask containing a mixture of CHCl₃/EtOH (1:1, V_t = 2 mL) and then this mixture was slowly evaporated on a rotary evaporator providing a thin film that was dried at high vacuum overnight. Then, the film was hydrated with 1 mL of an aqueous solution containing: HPTS (1 mM), HEPES (10 mM), NaCl (100 mM), pH 7.0. The resulting mixture was subjected to tumbling (rotation) for an hour and after that 9 freeze-thaw cycles (N₂(l) → 40 °C water bath). The resulting suspension was extruded 15 times across a 100 nm polycarbonate membrane and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25) using as eluent HEPES (10 mM), NaCl (100 mM), pH 7.0. The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL (approximate lipid concentration 6.6 mM).

Measurement protocol: 25 µL of the vesicle suspension were dispersed into a plastic cuvette containing 1980 µL of HEPES (10 mM), MX (100 mM), pH 7.0. At t = 20 s, NaOH is added (20 µL, 0.5 M) and at t = 100 s transporter aliquots (DMSO solutions) were added and the change in HPTS fluorescence (basification) was measured (λ_{exc} = 450 nm and λ_{em} = 510 nm). At t = 400 s, Triton-X 100 was added (50 µL, 10% solution in water) was added to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at t = 500 s.

The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (11)$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence value at a certain time, F₀ is the fluorescence value before the addition of the compound under study (i.e., 95 s) and F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 450 s).

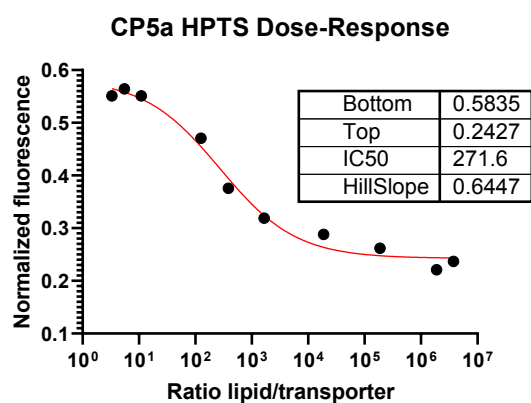
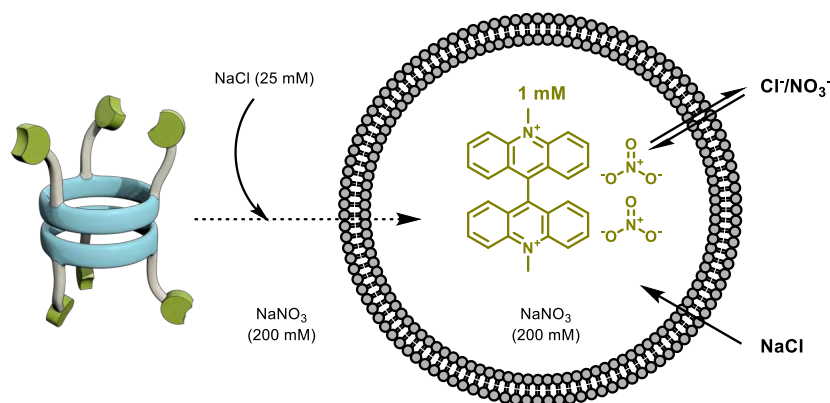


Figure 6. Hill curve of HPTS in LUVs presented as transporter:lipid ratio for **CP5a**.

<i>CP</i>				<i>CP5a</i>	<i>CP5b</i>
<i>Anion</i>	$r/\text{\AA}^{496}$	$1/r$	ΔG_{hyd} (kJ/mol)	Y	Y
F^-	1.31	0.763359	-465	0.55	0.7085
Cl^-	1.81	0.552486	-340	0.55	0.5485
Br^-	1.96	0.510204	-315	0.71	0.545
I^-	2.2	0.454545	-275	0.89	0.476
AcO^-	1.62	0.617284	-365	0.42	0.7615
NO_3^-	1.79	0.558659	-300	0.91	0.5645
ClO_4^-	2.4	0.416667	-430	0.71	0.60

Table 1. Normalized percentage of transport in the presence of different extravesicular sodium salts (100 mM) using a constant concentration of the transporters (1 μM).

⁴⁹⁶ Y. Marcus, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, 87, 2995-2999.

2.2.3 Lucigenin assay for Cl⁻ transport2.2.3.1 NaNO₃ buffer

25 μL of an EYPC (Sigma Aldrich) EtOH solution (1 g/mL) dispersed in a 10 mL round bottom flask containing a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (1:1, $V_t = 2$ mL) was slowly evaporated on a rotary evaporator to give a thin film that was dried at high vacuum overnight. Then, the film was hydrated with 1 mL of an aqueous solution containing: *N,N'*-Dimethyl-9,9'-bisacridinium dinitrate (lucigenin, 1 mM), NaNO_3 (200 mM). The resulting mixture was subjected to tumbling (rotation) for an hour and after that 9 freeze-thaw cycles ($\text{N}_2(\text{l}) \rightarrow 40^\circ\text{C}$ water bath). The resulting suspension was extruded 15 times across a 200 nm polycarbonate membrane and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25) using NaNO_3 (200 mM) as eluent. The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL (approximate lipid concentration 6.6 mM).

Measurement protocol: 50 μL of the vesicle suspension were taken into a plastic cuvette containing 1950 μL of a NaNO_3 solution (200 mM) in milli-Q water. At $t = 50$ s, NaCl is added (25 μL , 2 M) and at $t = 100$ s the transporter under study ($i\text{PrOH}$ solutions) was added and the change in lucigenin fluorescence (nitrate exchanged by chloride; halide collisions cause quenching of fluorophore) was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm). At $t = 400$ s, Triton-X 100 was added (50 μL , 10% solution in water) was added to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at $t = 500$ s.

The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (11)$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence value at a certain time, F_0 is the fluorescence value before the addition of the compound under study (i.e., 95 s) and F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 450 s).

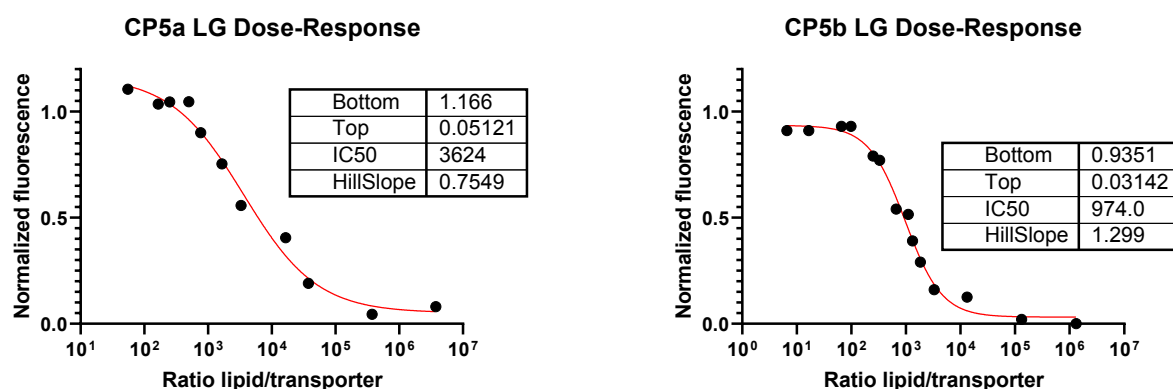


Figure 7. Hill curve of HPTS \supset LUVs presented as transporter:lipid ratio.

2.2.3.1.1. Kinetic analysis of the Cl⁻-induced quenching of LG

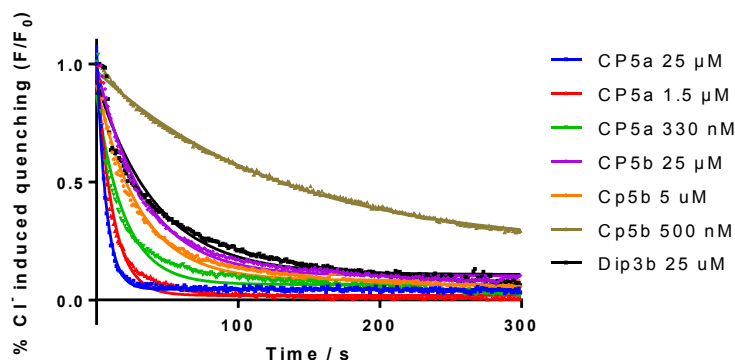
Several selected examples of different samples at a range of concentrations were analyzed to obtain the decay rate on the fluorescence of LG upon the interaction with Cl⁻ ions. For this purpose, we modified the normalization manner of the samples, so the initial values of fluorescence were set to 100% (1 in the Normalized Fluorescence axis) and the fully quenched state was assigned to 0. Also, we set as $t = 0$ the moment of the addition of the transporter molecule (see Figure 8 and Figure 9).

The decay curves of F/F_0 were fitted to monoexponential (Eq. 13) and double exponential (Eq. 14) decay functions after applying the following correction (Eq. 12):

$$\left(\frac{F}{F_0}\right)_c = \frac{F}{F_0} - g \cdot t \quad (12)$$

Where g was obtained by the linear fit of the last 50 s of the transport curves. This subtraction accounts for the unassisted transport of chloride to the vesicle interior without transporter and helps flatten the plateau region at high values of time.

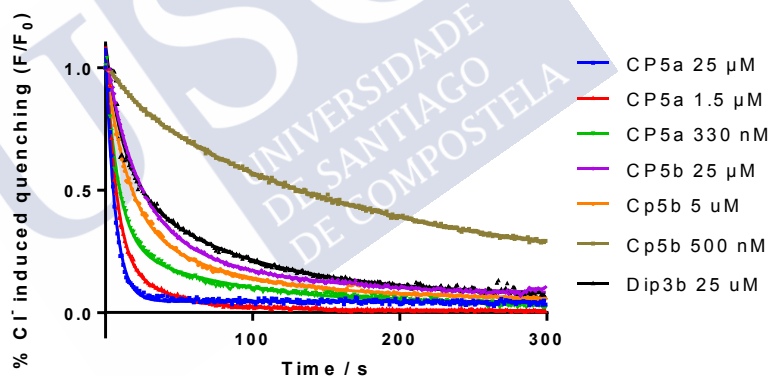
a. Monoexponential fit: $F(t) = span \cdot e^{-K \cdot t} + plateau \rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K}$ (13)



	CP5a 25 μM	CP5a 1.5 μM	CP5a 330 nM	CP5b 25 μM	Cp5b 5 uM	Cp5b 500 nM	Dip3b 25 uM
Span	1.036	0.9894	0.8044	0.8873	0.8294	0.7482	0.8230
K	0.1551	0.08927	0.05142	0.02922	0.03299	0.007642	0.02405
Plateau	0.04527	0.01903	0.06526	0.1027	0.08246	0.2220	0.1080
HalfLife	4.468	7.765	13.48	23.72	21.01	90.70	28.82

	CP5a 25 μM	CP5a 1.5 μM	CP5a 330 nM	CP5b 25 μM	Cp5b 5 uM	Cp5b 500 nM	Dip3b 25 uM
R square	0.9872	0.9755	0.9486	0.9913	0.9822	0.9978	0.9666

Figure 8. Monoexponential fit for Cl⁻ induced quenching of LG in the vesicular media.



	CP5a 25 μM	CP5a 1.5 μM	CP5a 330 nM	CP5b 25 μM	Cp5b 5 uM	Cp5b 500 nM	Dip3b 25 uM
Span1	~ 0.6745	0.2057	0.2510	0.3047	0.3352	0.7262	0.4990
K1	~ 0.1551	0.02649	0.01245	0.01212	0.01374	0.005644	0.01233
Span2	~ 0.3612	0.8720	0.7484	0.6752	0.6296	0.1308	0.5310
K2	~ 0.1553	0.1369	0.1127	0.04786	0.06782	0.03779	0.08361
Plateau	0.04527	0.008632	0.02964	0.07526	0.05540	0.1542	0.06889
HalfLife_1	~ 4.470	26.16	55.66	57.21	50.44	122.8	56.23
HalfLife_2	~ 4.465	5.065	6.149	14.48	10.22	18.34	8.290

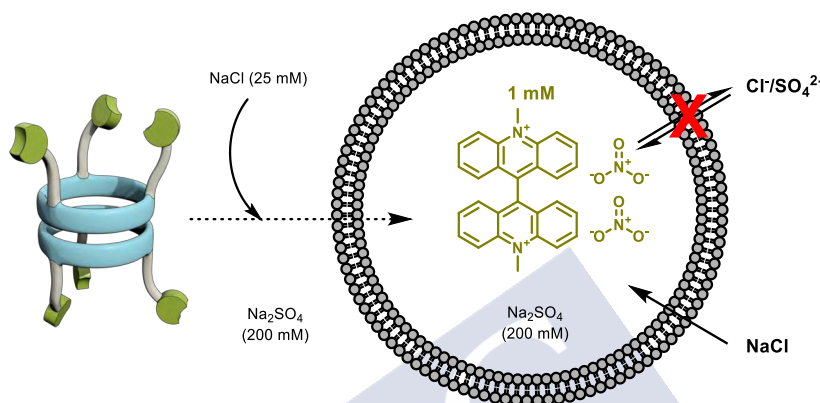
	CP5a 25 μM	CP5a 1.5 μM	CP5a 330 nM	CP5b 25 μM	Cp5b 5 uM	Cp5b 500 nM	Dip3b 25 uM
R square	0.9872	0.9918	0.9937	0.9983	0.9973	0.9993	0.9901

b. Double exp. fit: $F(t) = span1 \cdot e^{-K1 \cdot t} + span2 \cdot e^{-K2 \cdot t} + plateau$ (14)

Figure 9. Double exponential fit for Cl⁻ induced quenching of LG in the vesicular media.

Double exponential fitting seems to account better for the decay in the fluorescence as demonstrated by the R^2 values. This is typical of a process in which the outcome measured is the result of the sum of a fast and slow exponential decay.

2.2.3.2 Na_2SO_4 buffer



25 μL of a EYPC (Sigma Aldrich) EtOH solution (1 g/mL) into a 10 mL round bottom flask containing a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (1:1, $V_t = 2$ mL) and it was slowly evaporated on a rotary evaporator to give a thin film that was dried at high vacuum overnight. Then, the film was hydrated with 1 mL of an aqueous solution containing: *N,N'*-dimethyl-9,9'-bisacridinium dinitrate (lucigenin, 1 mM), Na_2SO_4 (200 mM). The resulting mixture was subjected to tumbling (rotation) for an hour and after that 9 freeze-thaw cycles (N_2 (l) \rightarrow 40 $^\circ\text{C}$ water bath). The resulting suspension was extruded 15 times across a 200 nm polycarbonate membrane and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25) using Na_2SO_4 (200 mM) as eluent. The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL (approximate lipid concentration 6.6 mM).

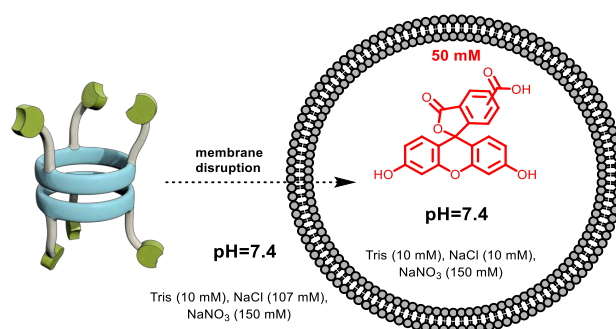
Measurement protocol: 50 μL of the vesicle suspension were taken into a plastic cuvette containing 1950 μL of Na_2SO_4 (200 mM). At $t = 50$ s, NaCl is added (25 μL , 2 M) and at $t = 100$ s transporter aliquots (iPrOH solutions) were added and the change in lucigenin fluorescence (nitrate exchanged by chloride; halide collisions cause quenching of fluorophore) was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm). At $t = 400$ s, Triton-X 100 was added (50 μL , 10% solution in water) was added to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at $t = 500$ s.

The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (11)$$

Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence value at a certain time, F_0 is the fluorescence value before the addition of the compound under study (i.e., 95 s) and F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 450 s).

2.2.4 Auto-quenched CF assay for leakage detection



Vesicles were prepared by taking 25 μL of an EYPC (Avanti Polar Lipids) EtOH solution (1 g/mL) into a 10 mL round bottom flask containing a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (1:1, $V_t = 2$ mL), which was slowly evaporated on a rotary evaporator to give a thin film that was dried at high vacuum overnight. Then, the film was hydrated with 1 mL of an aqueous solution containing: CF (50 mM), Tris (10 mM), NaCl (10 mM) and NaNO₃ (150 mM), pH 7.4. The resulting mixture was subjected to tumbling (rotation) for an hour and after that 9 freeze-thaw cycles ($\text{N}_2(\text{l}) \rightarrow 40^\circ\text{C}$ water bath). The resulting suspension was extruded 15 times across a 100 nm polycarbonate membrane and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25) using as eluent Tris (10 mM), NaCl (10 mM) and NaNO₃ (150 mM), pH 7.4. The resulting vesicle suspension was taken up in a total volume of 5 mL (approximate lipid concentration 6.6 mM).

Measurement protocol: 100 μL of the vesicle suspension were taken into a plastic cuvette containing 1900 μL of Tris (10 mM), NaCl (107 mM) and NaNO₃ (150 mM), pH 7.4. At $t = 20$ s, the compound under study (DMSO solution, 25–30 μM) was added and the change in CF fluorescence (due to leakage) was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 493$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm). At $t = 400$ s, Triton-X was added (100 μL , 1.2% solution in water) was added to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at $t = 500$ s.

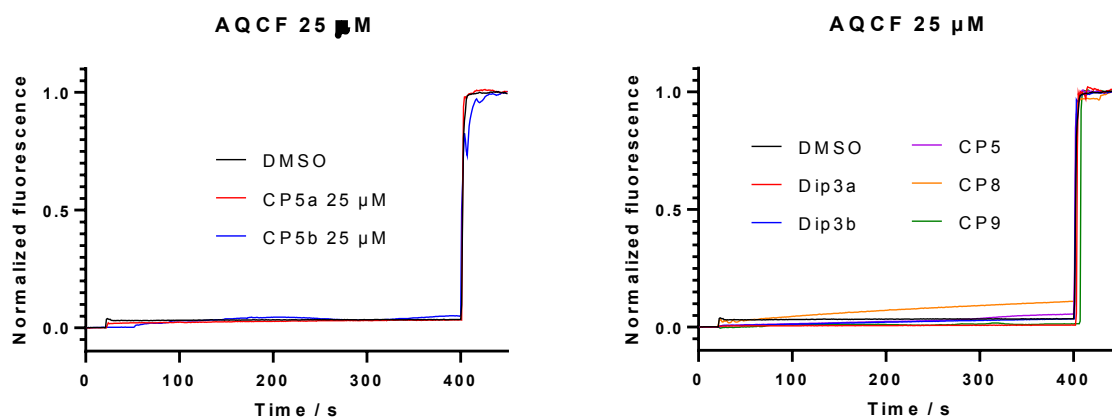
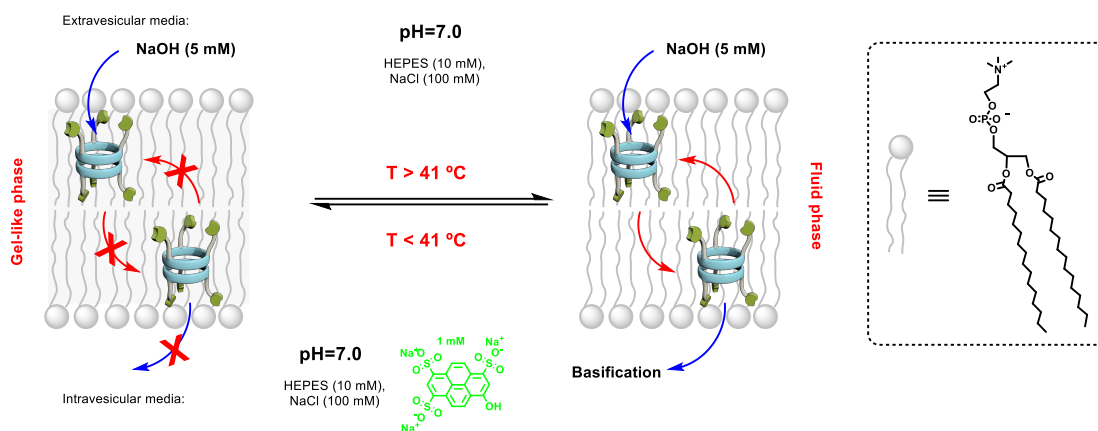


Figure 10. Traces of AQCF \supset LUVs assays for the transporter molecules based on the ionophore model (left) and the controls (right).

2.2.5 DPPC assay at variable temperature to unveil the transport mechanism.



DPPC (25 mg, 1 Equiv) and **CP5b** (1.7 mg, 0.05 Equiv) were dissolved in CHCl_3 (1 mL). The resulting mixture was slowly evaporated under vacuum. The lipid-transporter film was dried overnight under high vacuum and then it was hydrated for 1 h at 50 °C with 1 mL of an aqueous solution containing: HPTS (1 mM), HEPES (10 mM), NaCl (100 mM), pH 7.0. After that time, the mixture was sonicated for 30 s (degass mode) and subjected to 6 freeze-thaw cycles ($\text{N}_2(\text{l}) \rightarrow 50\text{ }^\circ\text{C}$ water bath). The resulting mixture was extruded through a 400 nm polycarbonate membrane (19 times) at 50 °C and finally purified by size exclusion chromatography (Sephadex G-25; eluant HEPES (10 mM), NaCl (100 mM), pH 7.0) at 50 °C to remove all extravesicular HPTS (final volume of vesicle suspension is 3 mL).

Measurement protocol: 400 μL of the vesicle suspension were taken into a plastic cuvette containing 2600 μL of HEPES (10 mM), NaCl (100 mM), pH 7.0 and left to stir for 5 min at 45 °C inside a thermostatic chamber before start recording any data. At $t = 150$ s after the experiment starts, NaOH was added (20 μL , 0.5 M) and the change in HPTS fluorescence (basification) was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm). At $t = 400$ s, Triton-X was added (50 μL , 10% solution in water) to lyse all the vesicles and normalize the fluorescence trace. Experiment ended at $t = 500$ s.

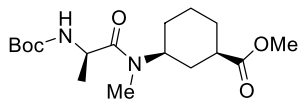
The data was normalized using the following equation:

$$F_n = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \quad (11)$$

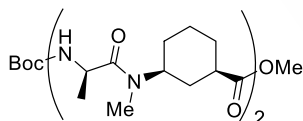
Where F_n is the normalized fluorescence, F_t is the fluorescence value at a certain time, F_0 is the fluorescence value before the addition of the compound under study (i.e., 140 s) and F_∞ is the fluorescence intensity after the total lysis of the liposomes (i.e., 450 s).

Chapter III

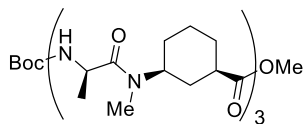
3.1. Synthesis and characterization



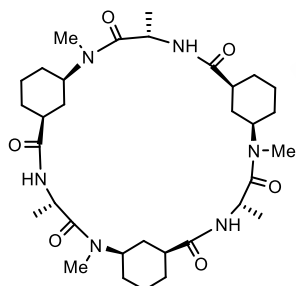
Boc-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*- γ -Ach-OMe (dip4): A solution of **Boc-^{Me}*N*-*L*- γ -Ach-OMe** (184 mg, 0.710 mmol) in a mixture of TFA/ CH₂Cl₂ (1:1, 5 mL) was stirred at r.t. for 15 min and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dried under high vacuum for 3 h. A solution of the resulting TFA salt in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was treated successively with DIEA (730 μ L, 4.26 mmol), Boc-*D*-Ala-OH (161 mg, 0.852 mmol) and, finally, *N*-HATU (298 mg, 0.781 mmol). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h and then poured into a separatory funnel. The organic layer was washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x10 mL) and NaHCO₃ (sat., 3x10 mL). The organic layer was dried with a desiccant, filtered and concentrated. The crude of reaction was purified by flash chromatography (15-25% AcOEt/hexane) affording **dip4** as a colorless oil [763 mg, 96%, *R_f* = 0.56 (50% AcOEt hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.50 (m, 1H), 4.59 - 4.40 (m, 1H), 4.40 - 4.20 (m, 1H), 3.55 (2s, 3H), 2.75 (2s, 3H), 2.46 - 2.22 (m, 1H), 1.88 - 1.38 (m, 6H), 1.31 (s, 9H), 1.20 - 1.11 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ): 175.1 & 174.7 (C), 172.4 & 172.0 (C), 154.9 (C), 79.2 (C), 54.9 (CH), 51.7- 51.5 (CH₃), 46.6 & 46.2 (CH), 42.5 & 42.2 (CH), 32.7 & 31.4 (CH₂), 29.8 & 28.7 (CH₂), 29.1 & 27.5 (CH₃), 28.2 (CH₃), 28.1 & 24.2 (CH₂), 19.8 & 18.8 (CH₃). **HRMS (ESI)** calculated for C₂₇H₃₃N₂O₅: 465.2384, found: 465.2379.



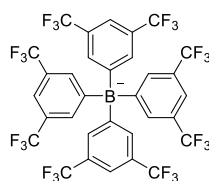
Boc-[(*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*- γ -Ach)₂]-OMe (tet4): A solution of **dip4** (80 mg, 0.23 mmol) in a MeOH/H₂O mixture (4:1, 2.5 mL) was treated with LiOH (28 mg, 1.15 mmol) and stirred at rt for 2 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous layer was acidified with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 3 and extracted with CH₂Cl₂ (4 x 5 mL). The combined organic layers were dried with anh. Na₂SO₄, filtered and concentrated to obtain **Boc-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*- γ -Ach-OH** as a white foam which was used in the next step without further purification. Separately, a different solution of **dip4** (80 mg, 0.230 mmol) in a mixture of TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 4 mL) was stirred at rt for 15 min. The solvent was removed under reduced pressure and dried in high vacuum for 3 h. The resulting TFA salt was dissolved in CH₂Cl₂ (3 mL) and DIEA (160 μ L, 0.920 mmol), **Boc-*D*-Ala-^{Me}*N*-*L*- γ -Ach-OH** and *N*-HBTU (109 mg, 0.290 mmol) were added. The solution was stirred at r.t. for 14 h and then washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x10 mL) and NaHCO₃ (sat., 3x10 mL), dried with anh. Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude of reaction was purified by flash chromatography (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) providing 118 mg of **tet4** as a white foam. [93%, *R_f* = 0.58 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **HRMS (ESI)** calculated for C₃₈H₅₁N₄O₇: 675.3752, found: 675.3744.



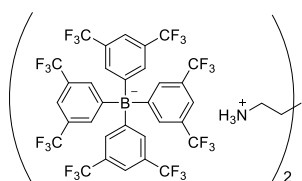
Boc-[(D-Ala-^{Me}N-L-γ-Ach)₃]-OMe (hex4): A solution of **dip4** (80 mg, 0.23 mmol) in a mixture MeOH/H₂O (4:1, 2.5 mL) was treated with LiOH (28 mg, 1.15 mmol) and stirred at r.t. for 2 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous layer was acidified with aqueous solution of HCl (10%) to pH 2 and extracted with CH₂Cl₂ (4x5 mL). The combined organic layers were dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated to obtain **Boc-D-Ala-^{Me}N-L-γ-Ach-OH** as a white foam which was used without further purification. Then, a solution of **tet4** (117 mg, 0.230 mmol) in a mixture of TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 3 mL) was stirred at rt for 15 min. The solvent was removed under reduced pressure and dried in high vacuum for 3 h. The resulting TFA salt was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and DIEA (160 μL, 0.920 mmol), **Boc-D-Ala-^{Me}N-L-γ-Ach-OH** and *N*-HBTU (109 mg, 0.290 mmol) were added. The solution was stirred at rt for 1.5 h and then poured into a separatory funnel. This was washed with aqueous solutions of HCl (5%, 3x10 mL) and NaHCO₃ (sat., 3x10 mL), dried with anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude of the reaction was purified by flash chromatography (0-3% MeOH/CH₂Cl₂) providing 170 mg of **Hex4** as a white foam. [97%, *R_f* = 0.62 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **HRMS (ESI) calculated** for C₄₉H₆₈N₆O₉: 885.5121, found: 885.5117.



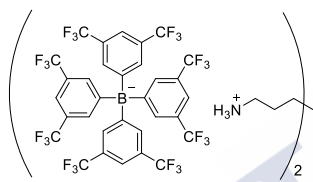
c-[(D-Ala-^{Me}N-L-γ-Ach)₃] (CP9): A solution of **hex4** (170 mg, 0.22 mmol) in a mixture MeOH/H₂O (4:1, 5 mL) was treated with LiOH (24 mg, 1.10 mmol) and stirred at r.t. for 14 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous layer was acidified with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 1 and extracted with CH₂Cl₂ (4 x 5 mL). The organic layers were dried with anh. Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*, to obtain the free acid as a white foam. This product was dissolved in a mixture of TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 4 mL) and stirred for 15 min. The solvent was removed under reduced pressure (3x) and dried in high vacuum for 5 h. The resulting TFA salt was dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL) and, then, DIEA (150 μL, 0.88 mmol) and *N*-TBTU (96 mg, 0.30 mmol) were successively added. The solution was stirred at r.t. overnight and after that time the volume was reduced to i.e., 25 mL. This organic solution was washed with aqueous solutions of HCl (10%, 3x10 mL) and NaHCO₃ (sat. 3x10 mL), dried over anh. Mg₂SO₄, filtered and concentrated. After purification by flash chromatography (0-6% MeOH/CH₂Cl₂), **CP9** was isolated as white solid [98 mg, 71%, *R_f* = 0.63 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.35 (d, *J* = 9.1 Hz, 3H), 5.17 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H), 4.55 (t, *J* = 11.9 Hz, 3H), 3.00 (s, 9H), 2.79 (s, 3H), 1.94-1.86 (m, 3H), 1.76 (t, *J* = 12.9 Hz, 6H), 1.68-1.56 (m, 8H), 1.51-1.36 (m, 8H), 1.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 9H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, δ): 175.1 (C), 173.1 (C), 51.6 (CH₃), 43.8 (CH), 43.2 (CH), 32.4 (CH₂), 29.8 (CH), 28.8 (CH₂), 28.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 19.0 (CH₃). **FTIR (neat):** ν = 3304 (amide A), 1669, 1620 (amide I), 1529 cm⁻¹ (amide II). **HRMS (ESI) calculated** for C₃₃H₅₅N₆O₆: 631.4178, found: 631.4176.



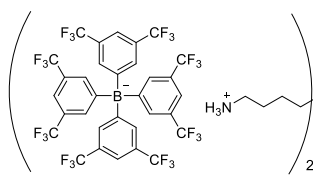
G1. Ethylenediammonium dichloride (3.0 mg, 0.023 mmol) and sodium *tetrakis*(3,5-*bis*(trifluoromethyl)phenyl)borate (40 mg, 0.045 mmol) were dissolved in MeOH (1 mL) and stirred overnight. Then, the solvent was evaporated and CH₂Cl₂ (2 mL) was added. The solution was centrifugated and the supernatant was concentrated to dryness to give the title compound as crystalline solid. [40 mg, quant.]. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz, δ): 7.73 (s, 8H), 7.58 (s, 4H), 3.55 (s, 4H).



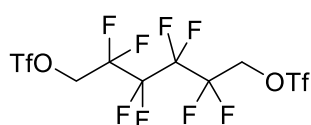
G2. 1,4-butanediammonium chloride (3.0 mg, 0.019 mg) and sodium *tetrakis*(3,5-*bis*(trifluoromethyl)phenyl)borate (33 mg, 0.038 mmol) were dissolved in MeOH (1 mL) and stirred overnight. Then, the solvent was evaporated and CH₂Cl₂ (2 mL) was added. The solution was centrifugated and the supernatant was concentrated to dryness to give the title compound as white solid. [32 mg, 95%]. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz, δ): δ 7.72 (s, 16H), 7.58 (s, 8H), 7.18 - 6.60 (m, 6H), 3.19 (br, 4H), 1.80 (br, 4H).



G3. 1,6-hexanediammonium chloride (3.0 mg, 0.016 mmol) and sodium *tetrakis*(3,5-*bis*(trifluoromethyl)phenyl)borate (28 mg, 0.032 mmol) were dissolved in MeOH (1 mL) and stirred overnight. Then, the solvent was evaporated and CH₂Cl₂ (2 mL) was added. The solution was centrifugated and the supernatant was evaporated to give the title compound as white solid. [27 mg, 92%]. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz, δ): δ 7.72 (s, 16H), 7.58 (s, 8H), 6.68 (br, 6H), 3.12 (m, 4H), 1.68 (br, 4H), 1.36 (br, 4H).

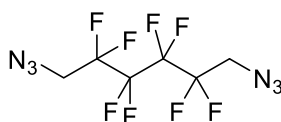


G4. 1,8-octanediamine (100 mg, 0.7 mmol) was treated with an aqueous solution of HCl (10%, V_t = 3.5 mL) for 5 min and then rotary evaporated to dryness, yielding 147 mg of 1,8-octanediammonium chloride. 3 mg of this powder were dissolved in MeOH (2 mL) and then sodium *tetrakis*(3,5-*bis*(trifluoromethyl)phenyl)borate (24.5 mg, 0.028 mmol) was added. After stirring the mixture for 5 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was resuspended in CH₂Cl₂ (2 mL), centrifugated, and the supernatant evaporated, yielding the title compound as a white powder. [25 mg, 96%]. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz, δ): 7.73 (s, 16H), 7.58 (s, 8H), 6.93 - 6.31 (brt, 6H), 3.16 (br, 4H), 1.76 (br, 4H), 1.31 (br, 8H).

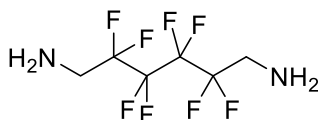


10.⁴⁵⁹ 2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoro-1,6-hexanediol (1.0 g, 3.82 mmol) was dissolved in freshly distilled CH₂Cl₂ (40 mL) and was cooled to 0 °C. (Tf)₂O (1 mL, 9.2 mmol) was added dropwise and, finally, dry Et₃N (2.14 mL, 15.3 mmol) was slowly incorporated into the

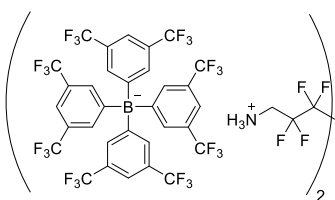
mixture. After stirring for 14 h, the solvent was removed, and the residue was dissolved in AcOEt (40 mL), which was further washed with H₂O (25 mL), aqueous HCl (5%, 25 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (25 mL) and brine (25 mL). The organic layer was dried with anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The slurry was recrystallized from a AcOEt/hexane mixture (1:3, 10 mL) and the resulting transparent needles were recovered by filtration. (700 mg, 34%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 4.82 (t, *J* = 12.1 Hz, 4H).



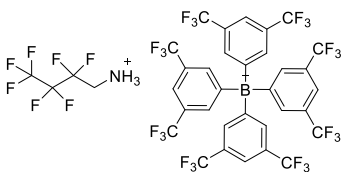
11.⁴⁵⁹ Ditriflate **10** (0.150 mg, 0.27 mmol) was dissolved in dry DMF (2 mL) and then NaN₃ (42 mg, 0.64 mmol) was added under Ar. After stirring for 3 h at room temperature, H₂O (5 mL) was added, and the resulting mixture was extracted with Et₂O (3x5 mL). The combined organic phases were washed with H₂O (3x5 mL) and dried with MgSO₄. After removing the solvent at reduced pressure, the title compound was isolated as a transparent oil (62 mg, 54%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 3.76 (t, *J* = 14.5 Hz, 4H).



12.⁴⁵⁹ Diazide **11** (60 mg, 0.15 mmol) and quinoline (1 μL, 0.008 mmol) were dissolved in EtOH (1 mL). Lindlar catalyst (3 mg, 0.028 mmol) was added under Ar and then H₂ (1 atm.) was introduced into the system. The reaction proceeded at room temperature for 6h. After this time, the suspension was filtered over a pad of celite. After removal of the solvent, aqueous HCl was added (10%, 2 mL) and this aqueous layer was washed with Et₂O (2x3 mL). Then, it was basified with NaOH and extracted with Et₂O (3x3 mL), dried with anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The resulting solid was sublimated at room temperature under vacuum (i.e., 1 mbar), yielding the diamine compound as a stinky crystalline white solid. (8 mg, 21%) ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 3.24 (t, *J* = 16.0 Hz, 4H), 1.35 - 1.18 (b, 4H).

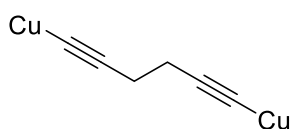


G6. Diamine **12** (3.3 mg, 0.012 mmol) was dissolved in aqueous HCl (10%, 1 mL) and stirred for 4 h. Afterwards, it was freeze-dried to afford a white solid that was used in the next step without further purification. This salt was dissolved in MeOH (1 mL) and treated with *tetrakis*(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)borate (21 mg, 0.024 mmol) for 3h. Then, the solvent was removed at reduced pressure and the residue was resuspended in CH₂Cl₂. After centrifugation, the supernatant was evaporated to yield the desired compound as a crystalline solid. (19 mg, 80%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.80 - 7.68 (m, 16H), 7.61 (s, 8H), 4.20 (s, 6H), 3.76 (t, *J* = 15.1 Hz, 4H). ¹⁹F NMR (CD₂Cl₂, 282.2 MHz, δ): -61.33, -116.51 (m), -120.50 (m).

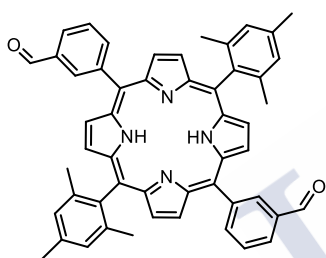


G7. 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-amine (35 μL, 0.25 mmol) was dissolved in an aqueous solution of HCl (10%, V_t = 2.5 mL) and stirred at room temperature for 7 h. After that time, the solution was concentrated to dryness and 40 mg of the

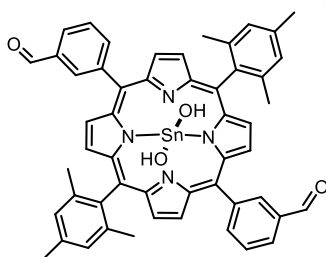
corresponding hydrochloride salt were recovered. 5 mg of the aforementioned salt were further dissolved in MeOH (1 mL) and *tetrakis*(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)borate (18 mg, 0.02 mmol) was added. After stirring the mixture overnight, the solvent was evaporated at reduced pressure. The resulting residue was resuspended in CH₂Cl₂ (2 mL), centrifugated, and the supernatant evaporated, yielding the title compound as a white powder. [20 mg, 94%]. ¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz, δ): 7.73 (s, 8H), 7.57 (s, 4H), 5.14 (br, 3H), 3.87 (t, *J* = 14.8 Hz, 2H). ¹⁹F NMR (CD₂Cl₂, 282.2 MHz, δ): -61.39, -79.25 (t, *J* = 10.4 Hz), -116.98 (d, *J* = 14.1 Hz), -125.89 (d, *J* = 25.1 Hz).



G8. To a solution of 1,5-hexadiyne (0.125 mL, 0.64 mmol) in EtOH (2.2 mL), freshly repurified CuCl⁴⁹⁷ (158 mg, 1.6 mmol) was added. After 30 min, the initial intense blue color of the mixture turned green. At this point, H₂O (5 mL) was added, and the precipitate was collected by vacuum filtration. Copper 1,5-hexadiyne bisacetylide **G8** was recovered as yellow solid, which was dried overnight in a desiccator. Spectroscopic data was in agreement with values reported in the literature.⁴⁹⁸ (65 mg, 50%).



Por1. This molecule was prepared following a previously described protocol in the literature.⁴⁶⁴ ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 10.32 (s, 2H), 8.76-8.69 (br s, 8H), 8.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.33 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.94 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.29 (s, 4H), 2.64 (s, 6H), 1.85 (s, 12H), -2.61 ppm (s, 2H).



Por1A. **Por1** (20 mg, 0.03 mmol) was dissolved in CHCl₃ (5 mL) and then a solution of SnCl₂·2H₂O (59 mg, 0.26 mmol) in EtOH (5 mL) was added. After refluxing this mixture for 6 h, Et₃N (250 μL, 60 equiv) was added and the stirring continued for additional 5 min. The solvent volume was reduced until i.e., 2 mL and the crude compound was purified by basic Al₂O₃ column chromatography (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) to yield the desired product as deep purple solid [8 mg, 36%, *R_f* = 0.35 (CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ):⁴⁹⁹ 9.18 - 9.02 (m, 4H), 9.02 - 8.86 (m, 4H), 8.56 - 8.41 (m, 2H), 8.41 - 8.24 (m, 2H), 7.98 (dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 2H), 7.93 - 7.72 (m, 2H), 7.34 (s, 4H), 5.84 (s, 2H), 3.92 - 3.80 (m, 4H), 3.80 - 3.69 (m, 4H), 2.66 (s, 6H), 2.00 - 1.77 (m, 12H), 1.45 - 1.17 (m, 12H), 2.04 - -2.16 (m, minor form), -2.29 - -2.54 (m, minor form), -7.42 (br, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ146.6 (C), 146.3 (C), 141.0 (C), 139.5 (C), 138.4 (C), 138.0 (C), 137.4 (C), 135.0 (CH), 133.6 (CH), 133.3 (C), 133.1 (CH), 131.2 (CH), 127.9 (CH), 126.9 (CH), 126.4 (CH), 120.6 (C), 119.5

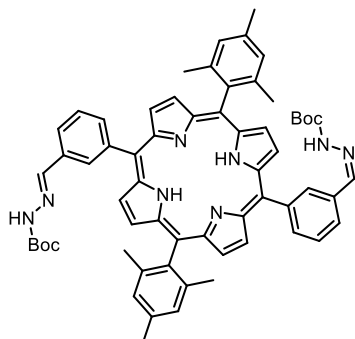
⁴⁹⁷ E. C. Davison, M. E. Fox, A. B. Holmes, S. D. Roughley, C. J. Smith, G. M. Williams, J. E. Davies, P. R. Raithby, J. P. Adams, I. T. Forbes, N. J. Press, M. J. Thompson, *Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, 12, 1494-1514.

⁴⁹⁸ Y. L. Chow, Gonzalo E. Buono-Core, *Can. J. Chem.* **1983**, 61, 795-800.

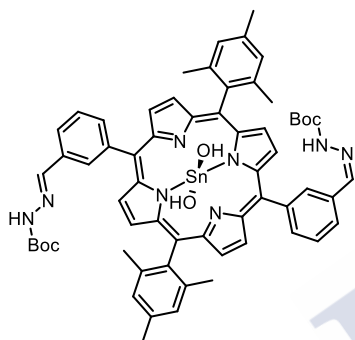
⁴⁶⁴ H. L. Ozores, M. Amorín, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 776-784.

⁴⁹⁹ The dialdehyde product is in equilibrium with its *bis*-diethyl acetal form.

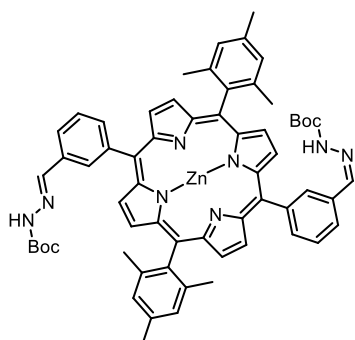
(C) 101.6 (CH), 61.4 (CH₂), 21.7 (CH₃), 21.5 (CH₃), 15.4 (CH₃). **HRMS (ESI)** calculated for C₆₀H₆₁N₄O₅Sn: 1037.3658, found: 1037.3672 (dehydrated *bis*-diethoxyacetal form).



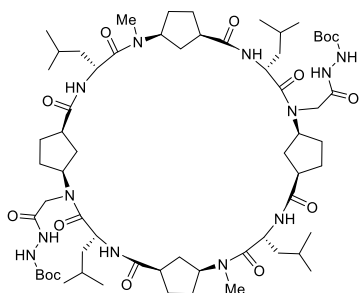
Por2. **Por1** (15 mg, 0.02 mmol) was mixed with *tert*-butyl carbazate (11 mg, 0.08 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) and stirred overnight. The crude mixture was purified by flash column chromatography (0-1% MeOH/CH₂Cl₂), to yield the desired compound as a violet solid. [19 mg, 95%, *R_f* = 0.17 (CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.79 - 8.68 (2AB, 8H), 8.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.14 (m, 4H), 7.76 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.28 (s, 4H), 5.85 (br, 2H), 2.65 (s, 6H), 1.87 (s, 12H), 1.51 (s, 18H), -2.62 (br, 2H). **HRMS (ESI)** calculated for C₆₂H₆₃N₈O₄: 983.4967, found: 983.4964.



Por2A. **Por2** (12 mg, 0.012 mmol) was dissolved in CHCl₃ (3 mL) and then a solution of SnCl₂·2H₂O (17 mg, 0.73 mmol) in EtOH (3 mL) was added. After refluxing this mixture for 6 h, Et₃N (110 μL, 60 equiv) was added and stirred for additional 5 min. The solvent volume was reduced until a final volume of i.e., 1 mL and the crude compound was purified by basic Al₂O₃ column chromatography (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) to give **Por2A** as purple solid. [45%, *R_f* = 0.30 (CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 9.05 (2AB, 8H), 8.52 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.42 - 8.34 (m, 2H), 8.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 8.06 - 7.96 (m, 2H), 7.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.34 (s, 4H), 2.67 (s, 6H), 1.89 (s, 3H), 1.54 (s, 9H), 1.27 (s, 9H). **HRMS (MALDI-TOF)** calculated for C₆₂H₆₃N₈O₆Sn: 1135.3902, found: 1135.3282.

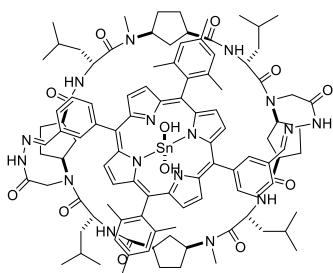


Por2B. This porphyrin was synthesized following the procedure described elsewhere.⁴⁶⁴ **¹H-RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.81 (br, 2H), 8.73 (AB, *J* = 3.5 Hz, 4H), 8.67 (AB, *J* = 3.5 Hz, 4H), 8.49 (br s, 2H), 8.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.09 - 7.96 (m, 4H), 7.70 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.26, 7.25 & 7.23 (3s, 4H), 2.60 (s, 6H), 1.88, 1.82 & 1.77 (3s, 12H), 1.45 ppm (s, 18H).



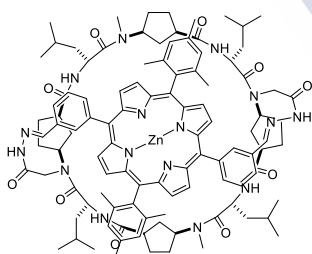
c-[(D-Leu-^{Me}N-L-γ-Acp-D-Leu-^{AcHyd}N-L-γ-Acp-)]₂ (CP10).

This compound was prepared following a synthetic route described by us.⁴⁶⁴ ¹H-RMN (5% DMSO *d*₆/CDCl₃, 500 MHz, δ): 9.57 (m, 2H), 8.42 (m, 4H), 6.86 (m, 2H), 5.21-5.06 (m, 2H), 4.90-4.64 (m, 8H), 3.94 (d, *J* = 12.2 Hz, 0.8H), 3.91 (d, *J* = 11.6 Hz, 1.2H), 3.23 (q, *J* = 8.0 Hz, 1.2H), 3.13 (m, 0.8H), 3.02 (s, 2.4H), 3.01 (s, 3.6H), 2.93 (m, 2H), 2.13-1.48 (m, 32H), 1.44 (s, 18H), 1.42-1.30 (m, 4H), 0.99-0.77 ppm (m, 24H).



CP10A. CP10 (20 mg, 0.016 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL) and treated with TFA (1 mL). After stirring for 1h, the solution was concentrated, redissolved in additional CH₂Cl₂ and evaporated to dryness again, repeating this process three times. The oily residue was further dried at high vacuum for 6h. This oil was dissolved in 6 mL of dry CH₂Cl₂ and slowly added to a solution of **Por2** (14 mg, 0.016 mmol) in dry CH₂Cl₂ (25 mL). The resulting mixture was stirred under Ar overnight. Then, the volume was

reduced by evaporation and the mixture was purified by basic Al₂O₃ column chromatography (0-15% MeOH/ CH₂Cl₂) to give the desired compound as bright purple solid (40%). ¹H NMR (10% DMSO *d*₆/CDCl₃, 500 MHz, δ): 11.28 - 10.88 (m, 2H), 9.12 - 8.67 (m, 10H), 8.35 - 7.60 (m, 12H), 7.32 - 7.04 (m, 4H), 5.14 - 3.93 (m, 12H), 2.62 - 2.16 (m, 22H), 2.03 - 0.53 (m, 66H), -7.31 - -7.51 (m, 1H), -7.51 - -8.03 (m, 1H). HRMS (MALDI-TOF) calculated for C₁₀₆H₁₁₉N₁₆O₁₁Sn: 1921.9048, found: 1921.9007 (dehydrated species).



CP10B. This compound was prepared following a synthetic route described by us from **CP10** and **Por1B**.⁴⁶⁴ ¹H NMR (10% DMSO *d*₆/CDCl₃, 500 MHz, δ): 11.36 (br, 1.6H), 11.29 (s, 2.4H), 8.93 - 8.60 (m, 16H), 8.88 and 8.80 (br, 4H), 8.43 (br, 4H), 8.30 and 8.25 (br and s, 4H), 8.23, 8.20 and 8.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 8H), 8.19 and 8.15 (t, 4H), 7.65 and 7.61 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H), 7.23 and 7.19 (s, 8H), 4.95 and 4.19 (br, 3.2H), 4.90 and 4.45 (m, 4.8H), 4.88 and 4.60 (m, 3.2H), 4.85 and 4.08 (d, *J* = 20.1 Hz, 4.8H), 4.50 and 4.30 (m, 8H), 2.71 and

2.59 (m, 8H), 2.56 and 1.71 (s, 24H), 2.44 and 2.03 (s, 12H), 2.36 (m, 12H), 2.19-1.12 (m, 72H), 1.12-0.63 ppm (m, 48H).

a. General procedure for Suzuki cross-coupling reaction:

Aryl-halide (1 equiv), aryl-boronic acid (1.25 equiv) and anh. K₃PO₄ (3 equiv) were loaded on a Schlenk tube and dissolved in dry and degassed DMF (0.1 to 0.05 M). Then, Pd(PPh₃)₄ (0.05 equiv) was added and the mixture was stirred overnight at 100 °C. After that time, the mixture was partitioned between water and AcOEt and the organic layer was washed with brine, dried

with anh. MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. The purification was carried out by flash column chromatography.

b. General procedure for Sonogashira cross-coupling reaction:

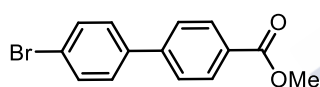
Aryl-halide (1 equiv), aryl-alkyne (1.25 equiv), CuI (0.1 Equiv) and PdCl₂(PPh₃)₂ (0.05 equiv) were loaded on a Schlenk tube and then a mixture of freshly distilled THF and Et₃N (3:1, 0.1-0.05 M) was added. The mixture was stirred under Ar at 50 °C overnight. After removing the solvents, the crude mixture was purified by flash column chromatography over SiO₂.

c. General procedure for alkyne reduction:

Alkyne-containing substrate (1 equiv) was dissolved in MeOH (0.1-0.05 M) and, under Ar, Pd/C (10 mol%) was added. After applying 1 atm of H₂ (balloon), the mixture was stirred overnight. The resulting black suspension was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo* to yield the saturated product.

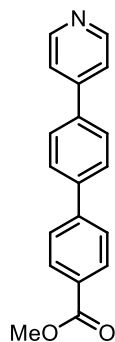
d. General procedure for methyl benzoate hydrolysis:

Methyl benzoate-derivative (1 equiv) was suspended in a mixture of THF/MeOH/H₂O (2:2:1, 0.05-0.02 M) and treated with NaOH (10 equiv). After stirring for, at least, 12h at 50 °C (completion of the reaction judged by TLC), the solution was acidified with 5% HCl until pH 1 and the resulting precipitated product was centrifuged and freeze dried to remove the remaining water.



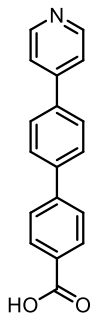
14. This intermediate was prepared from methyl 4-iodobenzoate (167 mg, 0.64 mmol) and 4-bromophenylboronic acid following general procedure A.⁵⁰⁰ [87%, *R_f* = 0.45 (40% CH₂Cl₂/hexane)]. **¹H**

NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.66 - 7.54 (m, 4H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H).

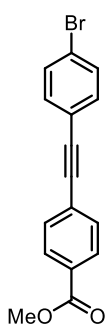


15. Intermediate **14** (50 mg, 0.17 mmol) and 4-pyridinylboronic acid were cross-coupled following procedure A to give **15** as white solid. [95%, *R_f* = 0.40 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.67 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.72 (s, 4H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 166.8 (C), 150.3 (CH), 147.5 (C), 144.5 (C), 140.6 (C), 137.7 (C), 130.3 (CH), 129.3 (C), 127.9 (CH), 127.5 (CH), 126.9 (CH), 121.4 (CH), 52.2 (CH₃). **HRMS (ESI)** calculated for C₁₉H₁₆NO₂: 290.1176, found: 290.1174.

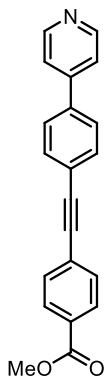
⁵⁰⁰ Y. Monguchi, J. Vagner, H. L. Handl, U. Jana, L. J. Begay, V. J. Hruby, R. J. Gillies, E. A. Mash, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 46, 7589-7592.



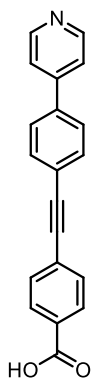
L1. 15 (59 mg, 0.21 mmol) was hydrolyzed as described in procedure **D** (27%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.88 - 8.75 (m, 2H), 8.24 - 7.99 (m, 6H), 7.99 - 7.83 (m, 2H). HRMS (ESI) calculated for C₁₈H₁₃NO₂: 275.0946, found: 275.0944.



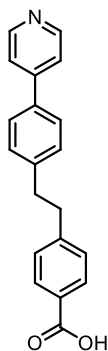
16. Following general protocol **B**, 1-bromo-4-ethynylbenzene and methyl 4-iodobenzoate (145 mg, 0.55 mmol) were reacted to yield the title compound as a slightly yellow solid. [70%, R_f = 0.18 (25% CH₂Cl₂/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.04 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 166.5 (C), 133.1 (CH), 131.7 (CH), 131.5 (CH), 129.6 (CH), 127.6 (C), 123.1 (C), 121.7 (C), 91.2 (C), 89.7 (C), 52.3 (CH₃). HRMS (ESI) calculated for C₁₆H₁₁BrO₂: 313.9942, found: 313.9948.



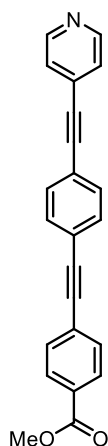
17. Compound **16** (50 mg, 0.16 mmol) and 4-pyridinylboronic acid were transformed into **17** (white solid) using protocol **A**. [70%, R_f = 0.30 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.70 (br, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.70 - 7.65 (m, 4H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 166.5 (C), 150.2 (CH), 147.4 (C), 138.1 (C), 132.4 (CH), 131.5 (CH), 129.7 (C), 129.5 (CH), 127.6 (C), 127.0 (CH), 123.6 (C), 121.5 (CH), 91.7 (C), 90.2 (C), 52.3 (CH₃). HRMS (ESI) calculated for C₂₁H₁₆NO₂: 314.1180, found: 314.1176.



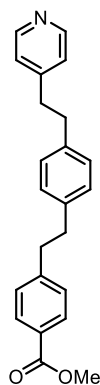
L2. This ligand was obtained from **17** (33 mg, 0.11 mmol) utilizing procedure **D**. (42%). ¹H NMR (DMSO *d*₆, 300 MHz, δ): 8.67 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H). HRMS (ESI) calculated for C₂₀H₁₄NO₂: 300.1017, found: 300.1019.



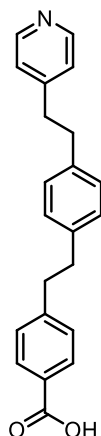
L3. Synthesized from **L2** (13 mg, 0.04 mmol) by protocol **C** and isolated as a solid (97%). **¹H NMR** (DMSO *d*₆, 300 MHz, δ): 8.68 - 8.56 (m, 2H), 7.93 - 7.79 (m, 2H), 7.79 - 7.65 (m, 2H), 7.65 - 7.49 (m, 2H), 7.44 - 7.25 (m, 2H), 3.09 - 2.86 (m, 4H). **HRMS (ESI)** calculated for C₂₀H₁₈NO₂: 304.1332, found: 304.1333.



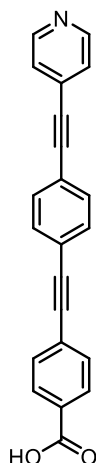
18. Asymmetric coupling of 1,4-diethynylbenzene (42 mg, 0.34 mmol) with 4-iodopyridine and methyl 4-iodobenzoate, provided title compound by means of protocol **B**. Purification by flash chromatography (40-80% AcOEt/hexane) afforded the desired product as a light orange solid. [19%, *R_f* = 0.16 (40% CH₂Cl₂/hexane)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.61 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.54 (s, 4H), 7.41 - 7.36 (m, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.93 (s, 3H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, δ): δ 166.5 (C), 149.7 (CH), 132.5 (C), 131.9 (CH), 131.8, 131.6 (CH), 131.2 (CH), 129.8 (C), 129.6 (CH), 127.5 (C), 125.5 (CH), 123.6 (C), 122.3 (C), 93.5 (C), 91.7 (C), 90.9 (C), 88.6 (C), 52.3 (CH₃). **HRMS (ESI)** calculated for C₂₃H₁₆NO₂: 338.1175, found: 338.1176.



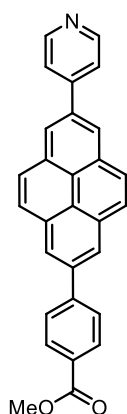
19. This molecule was obtained from **18** (10 mg, 0.03 mmol) using protocol **C**. [98%, *R_f* = 0.75 (AcOEt)]. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.30 - 7.20 (m, 4H), 7.07 (m, 6H), 3.93 (s, 3H), 3.00 - 2.88 (m, 8H). **HRMS (ESI)** calculated for C₂₂H₂₁NO₂: 331.1572, found: 331.1573.



L4. According to procedure **D**, **19** (10 mg, 0.03 mmol) was hydrolyzed to yield **L4**. (97%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ):⁵⁰¹ 8.58 - 8.39 (m, 2H), 8.09 - 7.89 (m, 2H), 7.19 - 6.96 (m, 6H), 3.44 - 3.26 (m, 8H), 2.69 - 2.36 (m, 8H), 1.75 - 1.53 (m, 8H), 1.53 - 1.37 (m, 8H), 1.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 12H). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_2$: 332.1645, found: 332.1648.

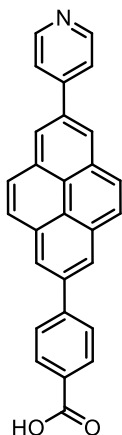


L5. This ligand was obtained from **18** (9 mg, 0.03 mmol) applying protocol **D**. (30%). $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO } d_6$, 300 MHz, δ): 8.43 - 8.32 (m, 2H), 7.78 - 7.64 (m, 2H), 7.50 - 7.35 (m, 6H), 7.31 (s, 2H). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 323.0946, found: 323.0940.

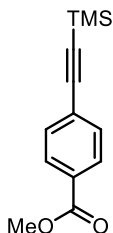


20. Asymmetric double Suzuki cross-coupling (procedure **A**) starting from commercially available 2,7-dibromopyrene (100 mg, 0.28 mmol), 4-pyridinylboronic acid and (4-(methoxycarbonyl)phenyl)boronic acid, provided the desired compound as yellow solid, after recrystallization from a 5% MeOH/ CH_2Cl_2 . [10%, $R_f = 0.53$ (10%MeOH/ CH_2Cl_2)]. $^1\text{H NMR}$ (5% MeOD d_4 / CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.77 - 8.71 (m, 2H), 8.43 (s, 4H), 8.22 - 8.11 (m, 6H), 7.98 - 7.89 (m, 4H), 3.95 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (5% MeOD d_4 / CDCl_3 , 75 MHz, δ): 167.2 (C), 149.7 (C), 149.4 (CH), 145.7 (C), 138.2 (C), 135.4 (C), 131.8 (C), 131.7 (C), 130.3 (CH), 129.0 (C), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 124.6 (C), 124.2 (CH), 123.9 (C), 123.5 (CH), 122.8 (CH), 52.2 (CH_3). **HRMS (ESI)** calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{20}\text{NO}_2$: 414.1484, found: 414.1489.

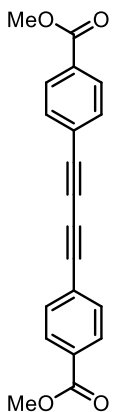
⁵⁰¹ For solubility reasons, in the NMR analysis, 1 equiv of TBAOH was added to increase the solubility of the product in organic solvents.



L6. Basic hydrolysis of **20**, as described in protocol **D**, afforded the pyrene-derivative as light orange solid. (quant.). ¹H NMR (DMSO *d*₆, 300 MHz, δ): 8.78 (s, 4H), 8.69 (s, 2H), 8.39 - 8.28 (m, 4H), 8.11 - 8.01 (m, 4H), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H). HRMS (ESI) calculated for C₂₈H₁₈NO₂: 400.1332, found: 400.1336.



21. Methyl 4-iodobenzoate (185 mg, 0.71 mmol) and ethynyltrimethylsilane were reacted following procedure **B**. After flash column chromatography (10% AcOEt/hexane), the title compound was isolated as a crystalline solid. Spectroscopic data is in agreement with values reported in the literature.⁵⁰² [73%, *R_f* = 0.53 (10% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.95 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 0.25 (s, 9H).



22.⁵⁰³ **21** (95 mg, 0.41 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, *V_t* = 4 mL) and then an aqueous solution of KOH (1 M, 0.33 mL) was added dropwise. After stirring for 1 h, the mixture was diluted with H₂O (3 mL) and the phases separated. The aqueous layer was acidified with 10% HCl and the resulting white precipitate was extracted with CH₂Cl₂ (3x10 mL). The combined extracts were dried with anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated, to give an orange solid that was used in the next step without further purification. Then, the previous product was dissolved in CH₂Cl₂ and treated with TMEDA (203 μL, 10 equiv) and CuCl⁵⁰⁴ (148 mg, 10 equiv). After 2 h stirring in open air, H₂O (3 mL) was added and the organic layer was further washed with H₂O (3x5 mL). After drying, filtering and concentrating the solvent, the crude was purified by SiO₂ column chromatography (10% AcOEt/hexane). [40% over 2 steps, *R_f* = 0.54 (10% AcOEt/hexane)]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H), 3.93 (s, 6H).

⁵⁰² S. R. Parsons, J. F. Hooper, M. C. Willis, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 998-1000.

⁵⁰³ A. S. Batsanov, J. C. Collings, I. J. S. Fairlamb, J. P. Holland, J. A. K. Howard, Z. Lin, T. B. Marder, A. C. Parsons, R. M. Ward, J. Zhu, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 703-706.

⁵⁰⁴ CuCl was purified prior to its use to remove CuCl₂: it was dissolved in 37% HCl, precipitated by adding water, centrifuged (washed with further portions of water) and freeze dried. Stored under inert gas shielded from light.



L7. Methyl ester **22** (10 mg, 0.03 mmol) was hydrolyzed following protocol **D**. (96%). ^1H NMR (DMSO d_6 , 300 MHz, δ): 13.23 (br, 2H), 7.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H). HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 291.0652, found: 291.0656.

3.2. Computational analysis of the interaction between **D5a** and alkyldiammonium guests.

	G2		G3		G5		G4	
	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)
E_{BSSE}	0,017166134	10,77192075	0,021210286	13,30966657	0,024687479	15,49163995	0,027650491	17,35095961
	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)
E_{inter}	0,225327924	-141,3955256	0,213510754	-133,9801332	0,193275375	-121,2822306	0,203104755	-127,4502648
	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)	E. (Hartree)	E. (kcal/mol)
E_{complex}	6281,440312	-86,14105184	6202,796962	-99,73676947	6163,457881	-86,09218889	6124,138705	-91,06892113

Table 2. Summary of BSSE, interaction and complexation energies of the different alkyldiammonium guests with the capsule **D5a**. Energy values were calculated using B3LYP/6-31G(d).⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸

3.3. NMR sample preparation protocol.

a) General procedure for the preparation of heterodimers **D5a-8** and **D5a-9**.

A 5 mm NMR tube was loaded with a TMSS solution (10 μL , 31 mM) of the appropriate deuterated solvent, **CP5a** (2.5 mg, $1.2 \cdot 10^{-6}$ mol of dimer) and 240 μL of CD_2Cl_2 or THF d_8 . At this point the NMR tube was equipped with a narrower 3 mm tube that was used empty for the purpose of increasing the height of the solution. On a separate vial, a solution of **CP8/CP9** (30 mM) in the same deuterated solvent was prepared, so the addition of 10 μL of the later solution represented 0.25 equiv with respect to the amount of **CP5a** inside the NMR tube. With this approach, the final concentration of heterodimer in the sample is 8.4 mM.

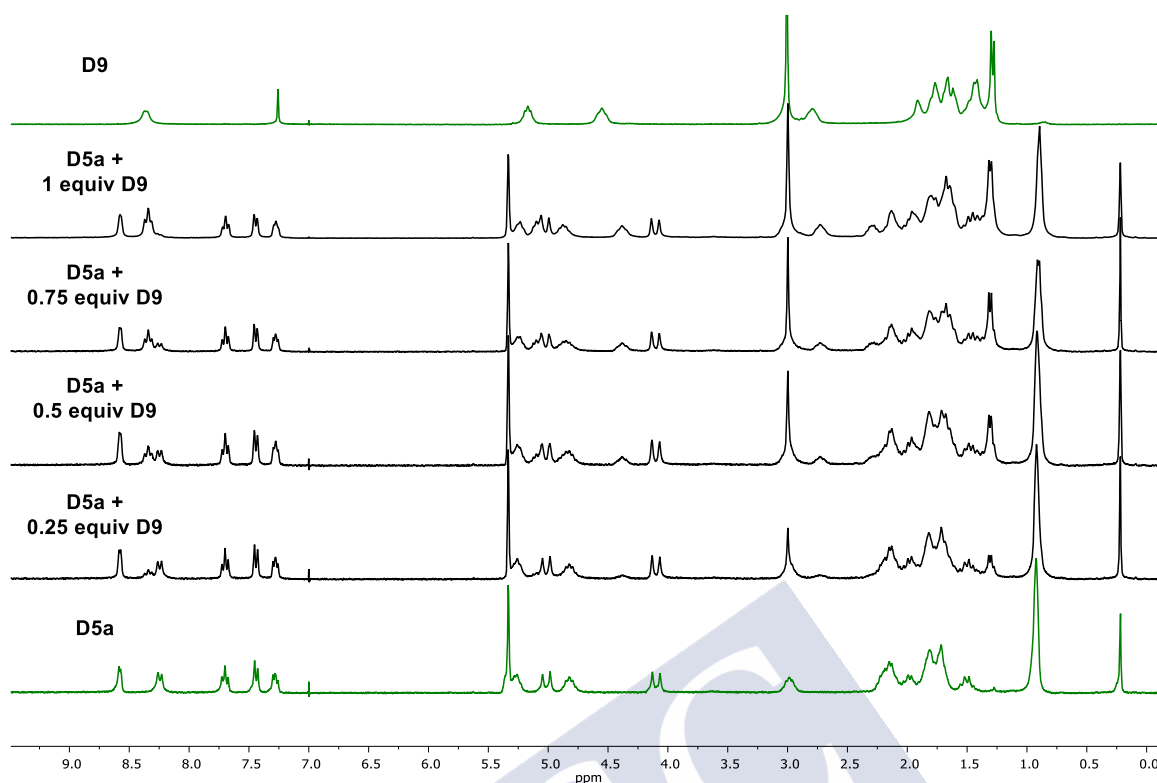


Figure 11. Formation of **D5a-9** in deuterated dichloromethane upon the addition of increasing amount of **CP9** to a 5 mM solution of **CP5a**.

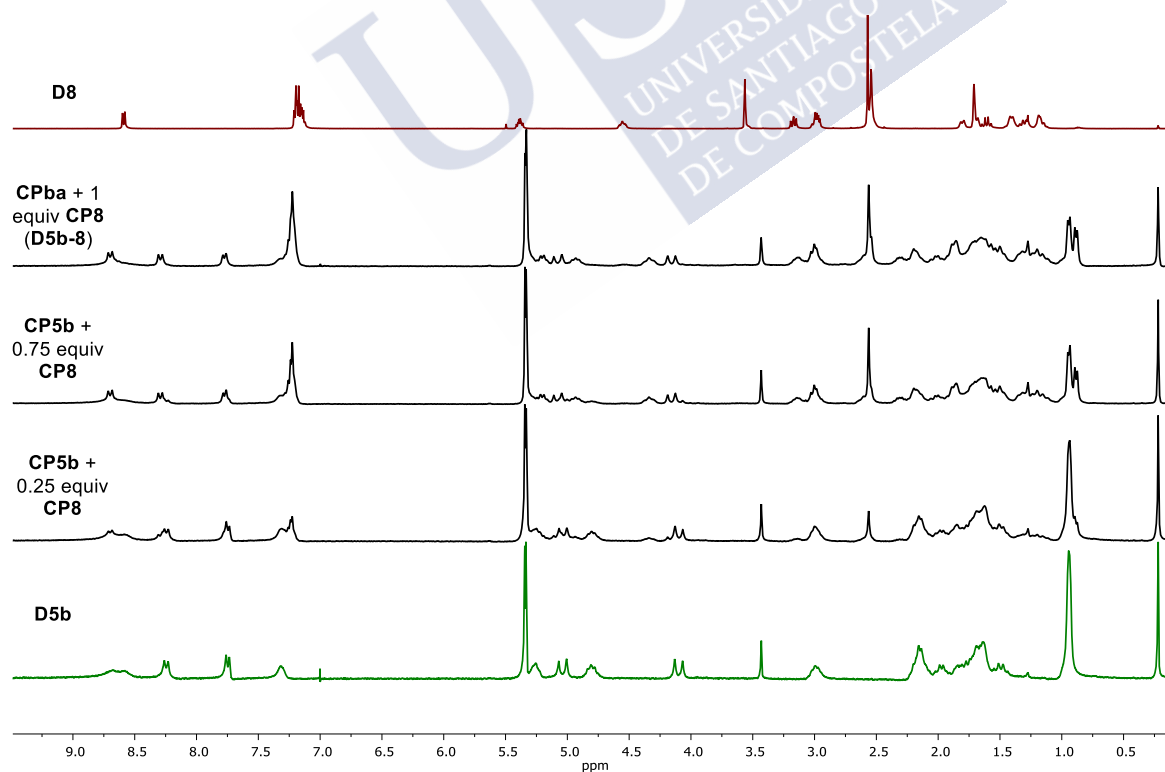


Figure 12. Formation of **D5b-8** in deuterated dichloromethane upon the addition of increasing amount of **CP8** to a 5 mM solution of **CP5b**.

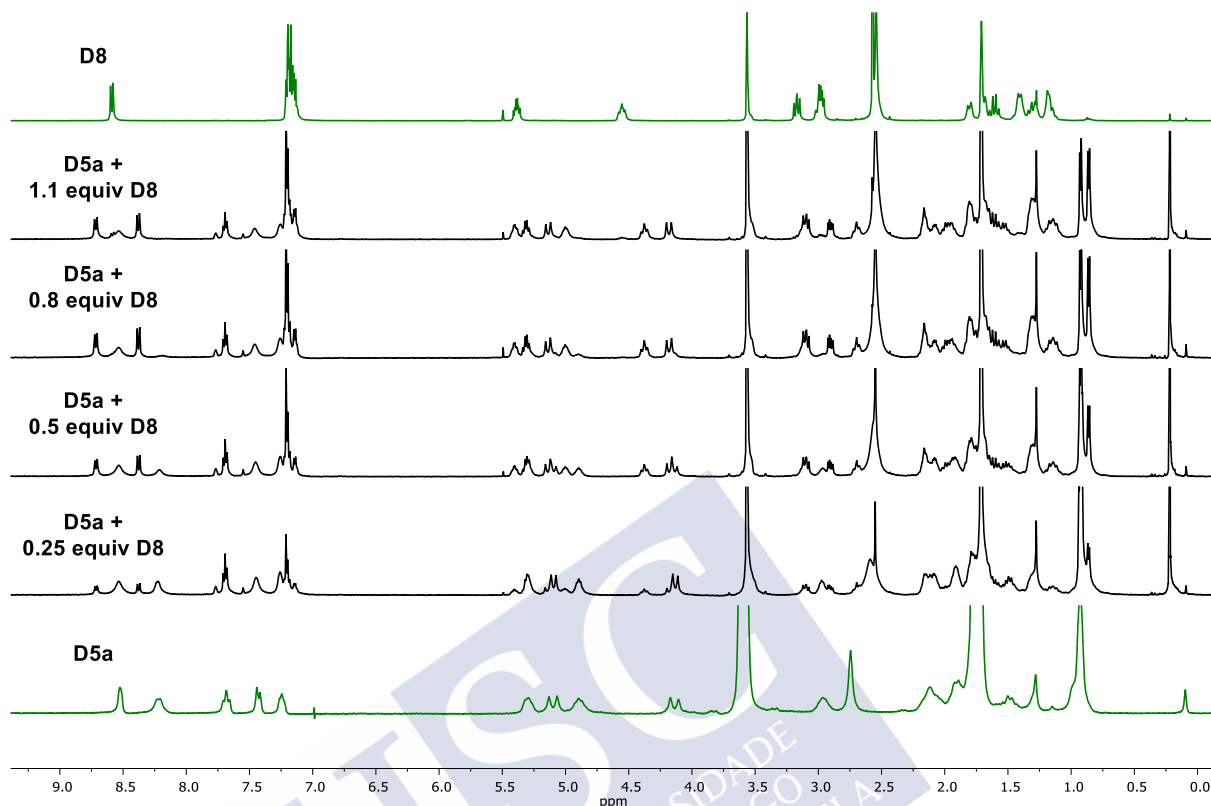


Figure 13. Formation of **D5a-8** in deuterated THF.

b) General procedure for the titrations of diammonium salts with **D5a**.

A 5 mm NMR tube was loaded with a CD_2Cl_2 TMSS solution (10 μL , 31 mM), **CP5a** (2.5 mg, $1.2 \cdot 10^{-6}$ mol of dimer) and 240 μL of CD_2Cl_2 . At this point the NMR tube was equipped with a narrower 3 mm tube that was used empty for the purpose of increasing the height of the solution. On a separate vial, a solution of **G2-4,6** (30 mM) in the same deuterated solvent was prepared, so the addition of 10 μL of the later solution represented 0.25 equiv with respect to the amount of **CP5a** inside the NMR tube. With this approach, the final concentration of dimer/salt in the sample is 4.2 mM. For **G5** and the titration of more than 1 equiv of **G3** per dimer, the concentration of the salt stock solution was increased proportionally so that 10 μL were equivalent to 1 or 0.33 equiv, respectively.

For DOSY experiments, all components were incorporated to the NMR tube since the beginning of the experiment: TMSS solution (10 μL , 31 mM), **CP5a** (5 mg, $2.5 \cdot 10^{-6}$ mol of dimer), **G2-6** ($2.5 \cdot 10^{-6}$ mol) and 240 μL of CD_2Cl_2 (10 mM). Dilutions were prepared from this sample by addition of CD_2Cl_2 .

c) General procedure for the metalation of **D5a**.

A 5 mm NMR tube was loaded with a THF d_8 TMSS solution (10 μ L, 31 mM), **CP5a** (2.5 mg, $1.2 \cdot 10^{-6}$ mol of dimer) and 440 μ L of THF d_8 . Then NaBAR_F ($2.5 \cdot 10^{-6}$ mol) and CuI ($2.5 \cdot 10^{-6}$ mol) were added.⁵⁰⁵ The resulting transparent solution was sonicated or mechanically shaken for several minutes until reaching maximum conversion point and then the iodide is precipitated by addition of AgNO₃ ($2.5 \cdot 10^{-6}$ mol). Further mixing for several hours yields the desired complex.

3.4. Determination of K_a from diffusion data

For host-guest system (1:1 ratio) in fast equilibrium in the NMR time scale, the mol fraction of bound guest (X_{HG}) to the host can be easily obtained by comparing the diffusion value of the guest bound to the host in a particular DOSY experiment (D_{obs}) and the values of the free guest (D_G) and the host-guest complex (D_{HG}).³⁹¹ This last parameter, in systems where the interaction takes place inside the host system, can be assumed that D_{HG} is the same as the diffusion of the free host species (D_H). Hence:

$$D_{obs} = X_{HG} \cdot D_{HG} + X_G \cdot D_G \quad / \quad X_{HG} + X_G = 1$$

$$D_{obs} = X_{HG} \cdot D_{HG} + (1 - X_{HG}) \cdot D_G \quad (7)$$

After the obtention of the bound guest fraction (X_{HG}) from Eq. 7, this value can be substituted in the equilibrium and molar fraction expressions to obtain the K_a value as follows (Eq. 8), assuming that the initial concentration of host and guest molecules is the same ($[G]_i = [H]_i$).

$$K_a = \frac{[HG]}{[H] \cdot [G]} \quad / \quad X_{HG} = \frac{[HG]}{[G] + [HG]} = \frac{[HG]}{[G]_i}$$

$$K_a = \frac{X_{HG} \cdot [G]_i}{[H] \cdot [G]} \rightarrow K_a = \frac{X_{HG} \cdot [G]_i}{[(1 - X_{HG}) \cdot [H]_i] \cdot [(1 - X_{HG}) \cdot [G]_i]} \rightarrow$$

$$K_a = \frac{X_{HG}}{[C]_i \cdot (1 - X_{HG})^2} \quad (8)$$

Even though the CP dimer, our host entity, is itself at equilibrium with its monomeric form, we can make the assumption that at the working concentration range (i.e., 2-10 mM), and due to their elevated K_a ($>10^6$), more than 99% of the CP molecules will be in the dimeric host state.

⁵⁰⁵ The outcome is the same if all components (until that point) are incorporated as solids in the NMR tube and dissolved together with deuterated THF.

³⁹¹ L. Avram, Y. Cohen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 586-602.

3.5. Alkyldiammonium host-guest interactions by NMR

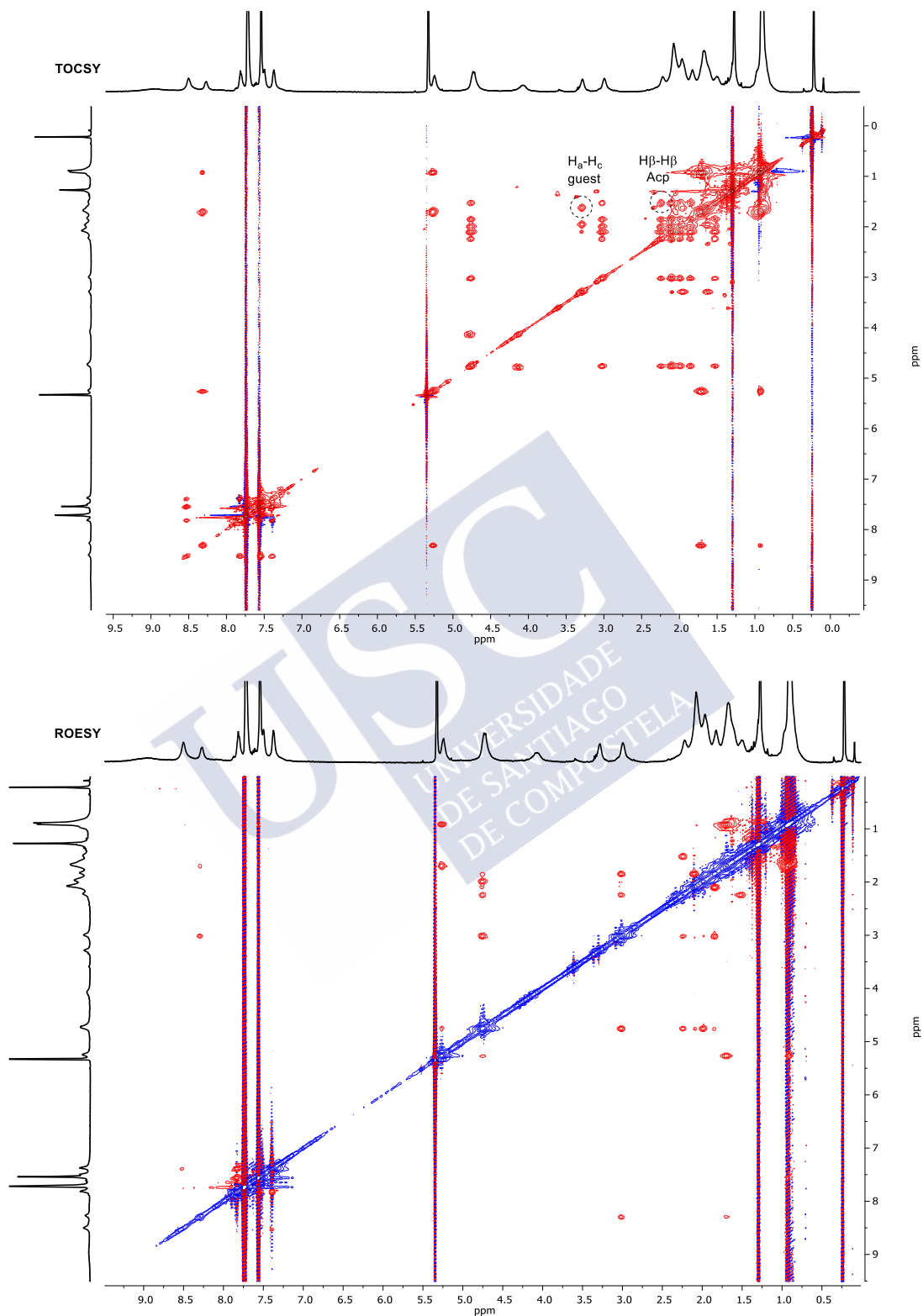


Figure 14. Bidimensional NMR experiments for **G3D5a** in which relevant cross-peaks are highlighted.

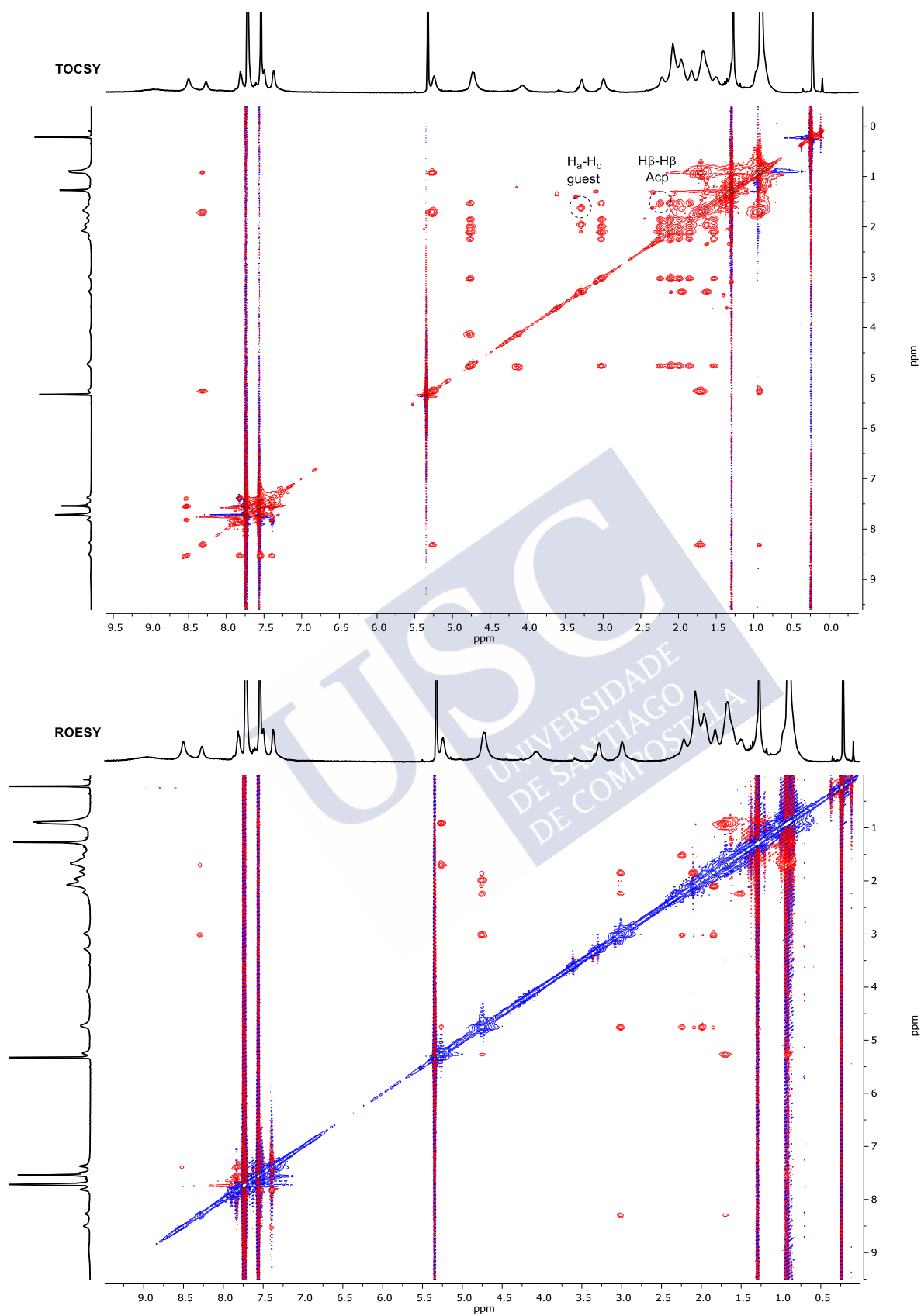


Figure 15. Bidimensional NMR experiments for **G3D5a** in which relevant cross-peaks are highlighted.

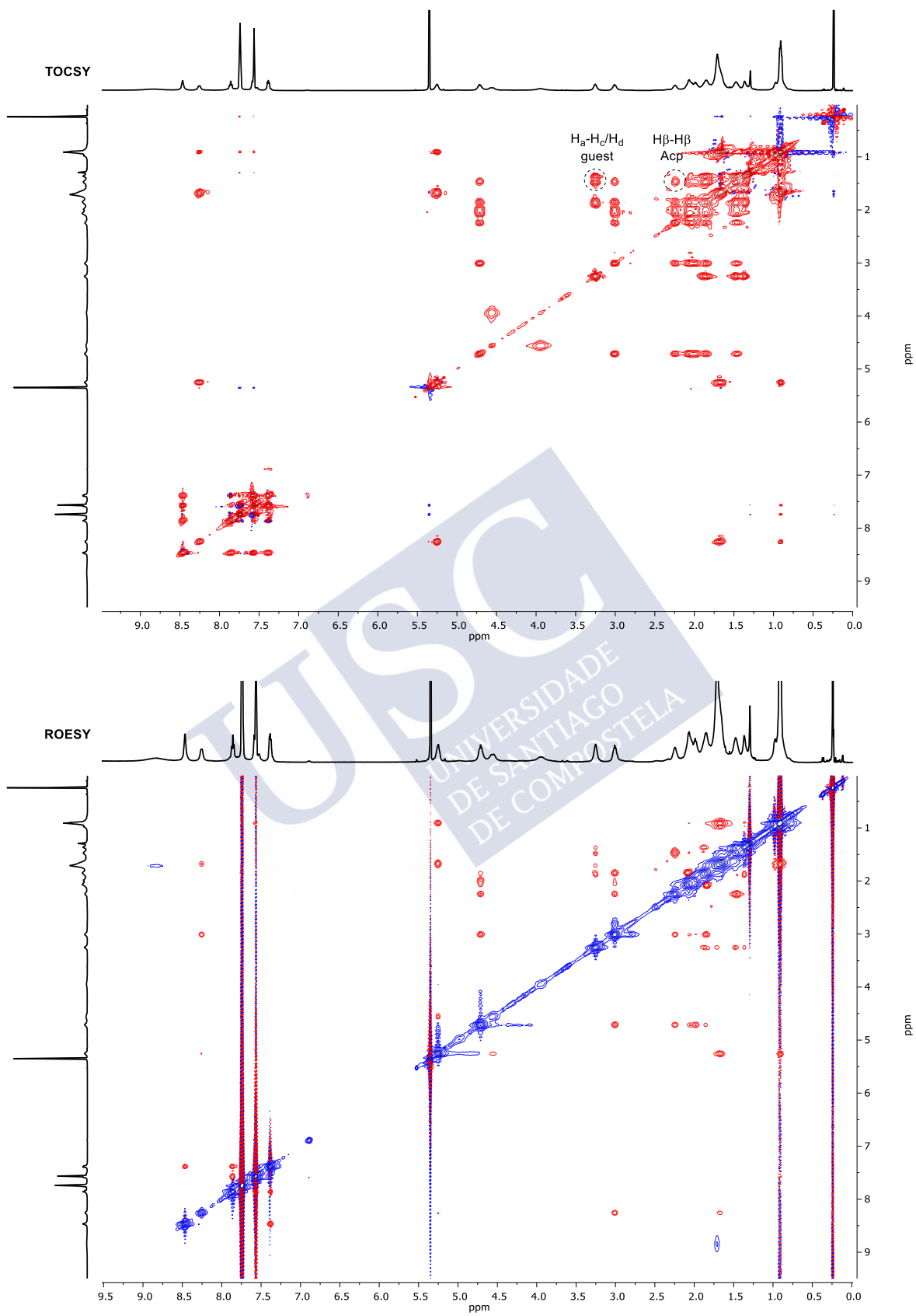


Figure 16. Bidimensional NMR experiments for **G4D5a** in which relevant cross-peaks are highlighted.

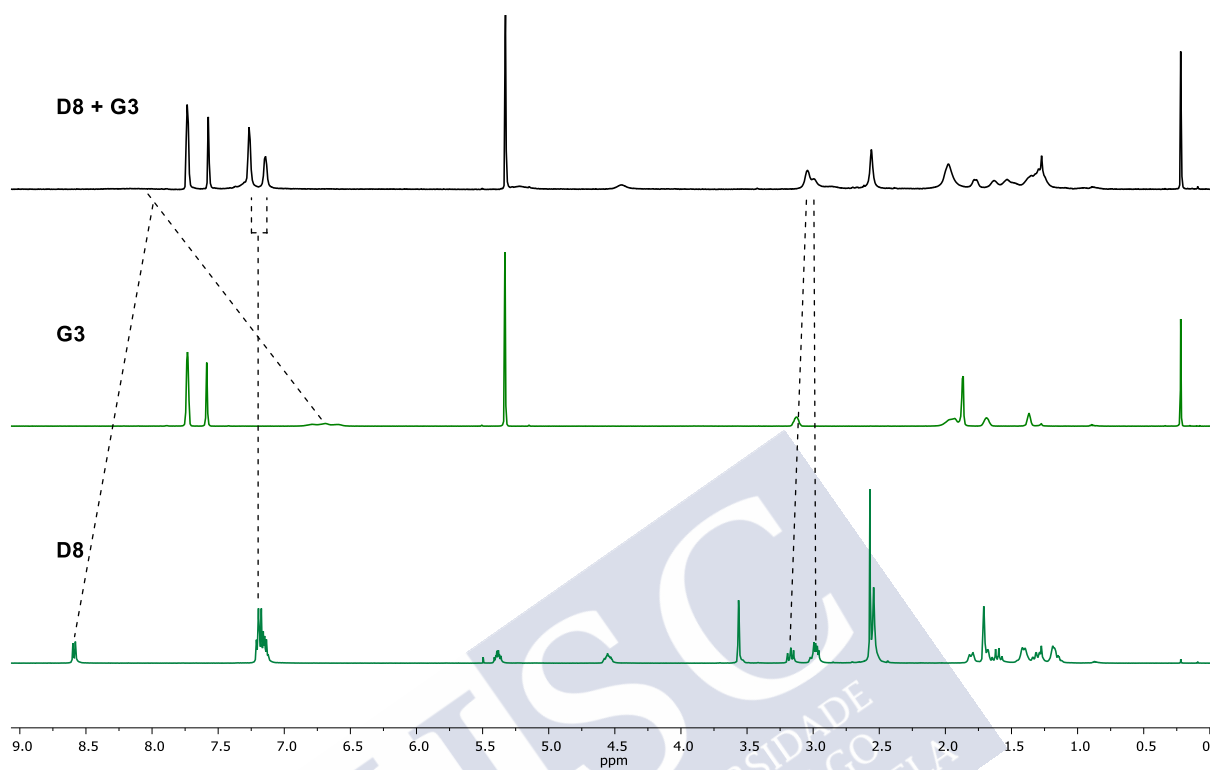
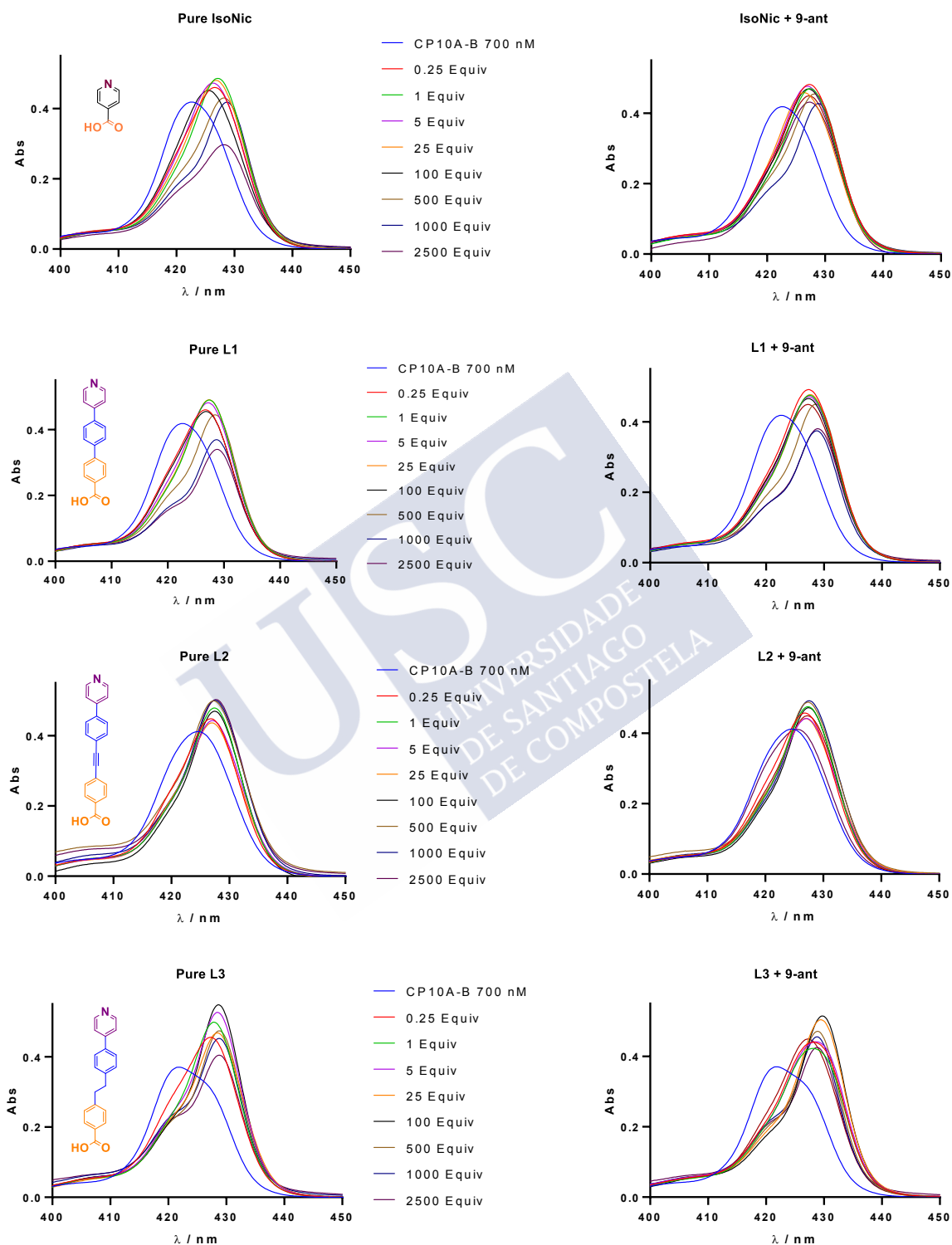


Figure 17. Interaction of 1 Equiv **G3** with **D8** in CD_2Cl_2 (5mM).

3.6. UV-vis titrations of L1-7 and La with the mixture CP10A-B in CHCl₃



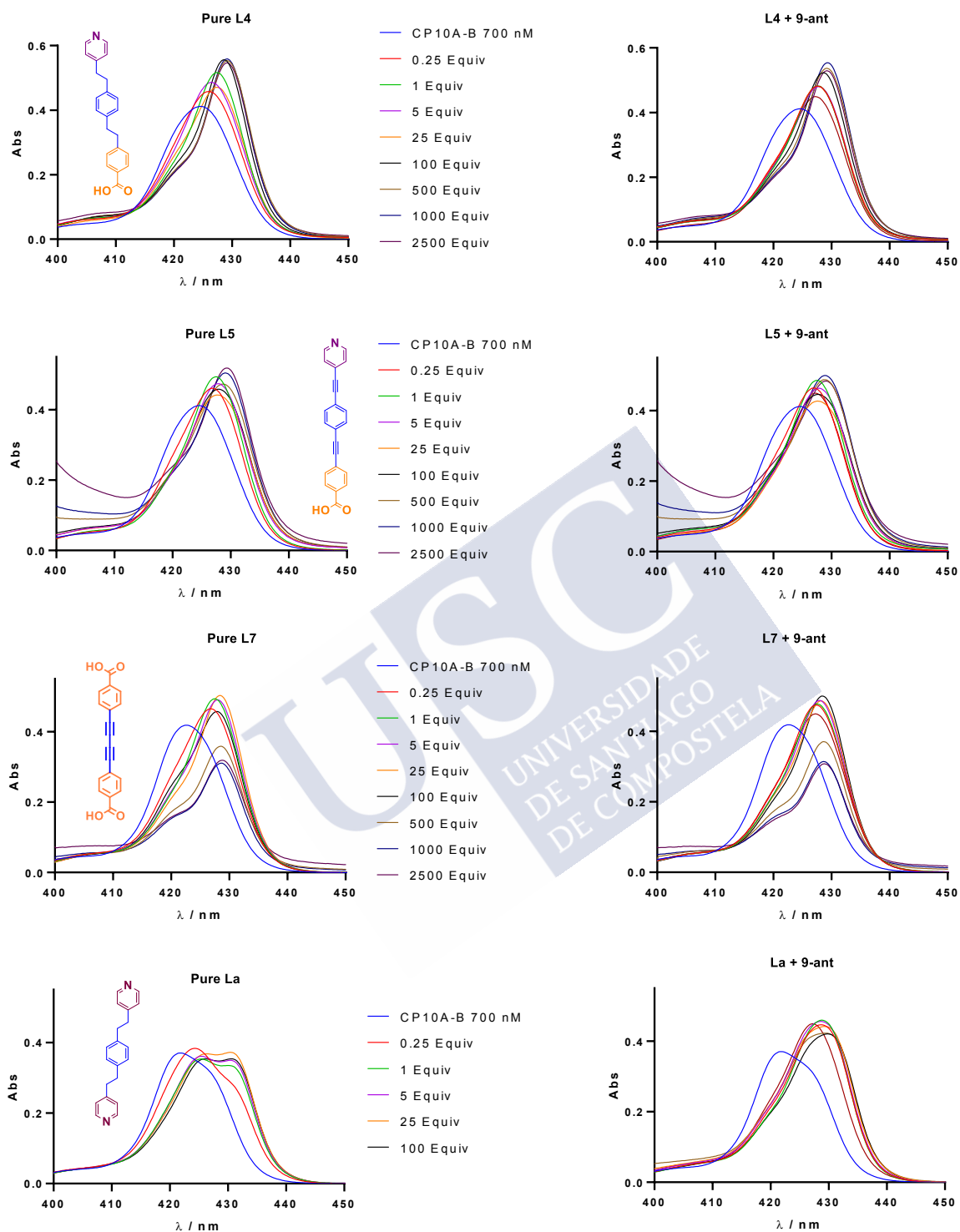


Figure 18. Soret band region of the titrations of CP10A-B with the homo- and heterofunctional ligands. **9-ant**, **L7** and heterodifunctional ligands **L1-5** were added from DMSO stock solutions, whereas **La** was taken from a CHCl_3 stock solution.

3.7. ESI-MS analysis of the complexation of CuI by CP5a/D5a

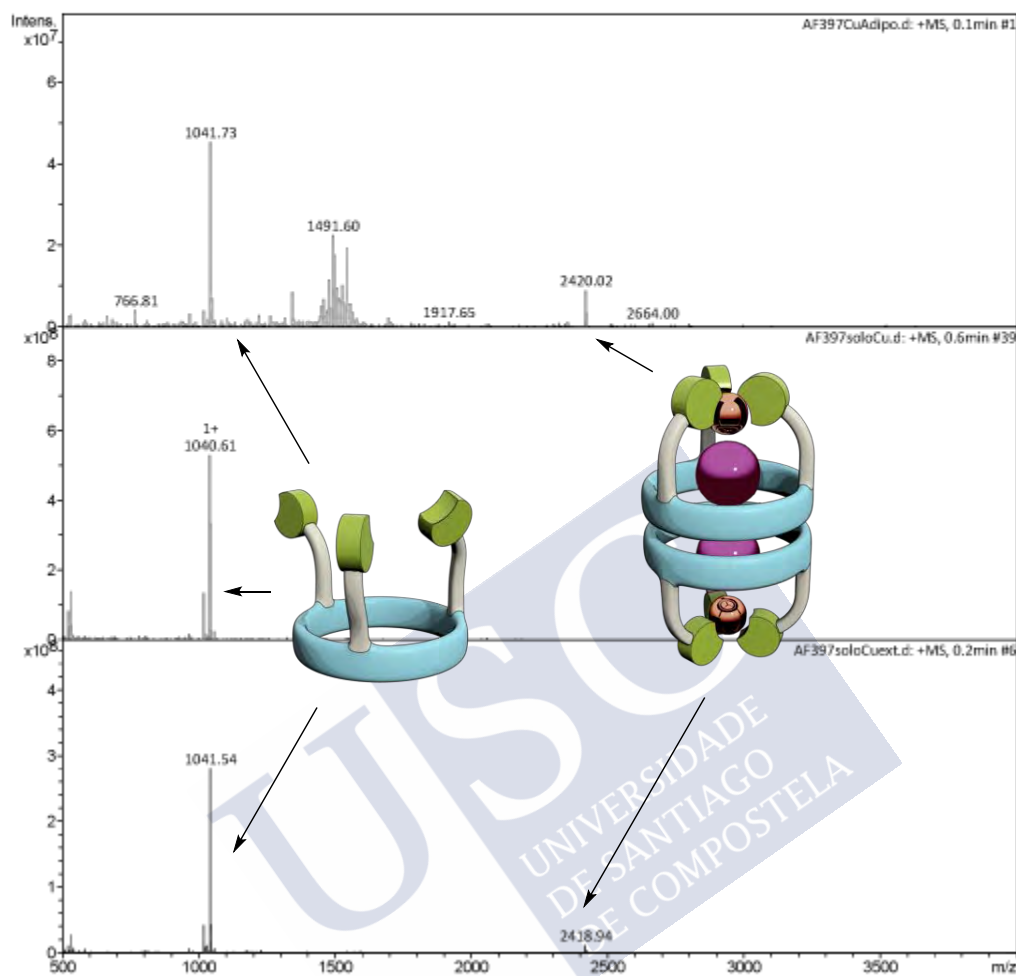


Figure 19. MS (ESI) analysis of the CuI coordination process by **CP5a**. Top: mixture of peptide, adiponitrile and CuI. Middle: pure **CP5a**. Bottom: mixture of **CP5a** and CuI.



Anexo:
Espectros de RMN y FT-IR



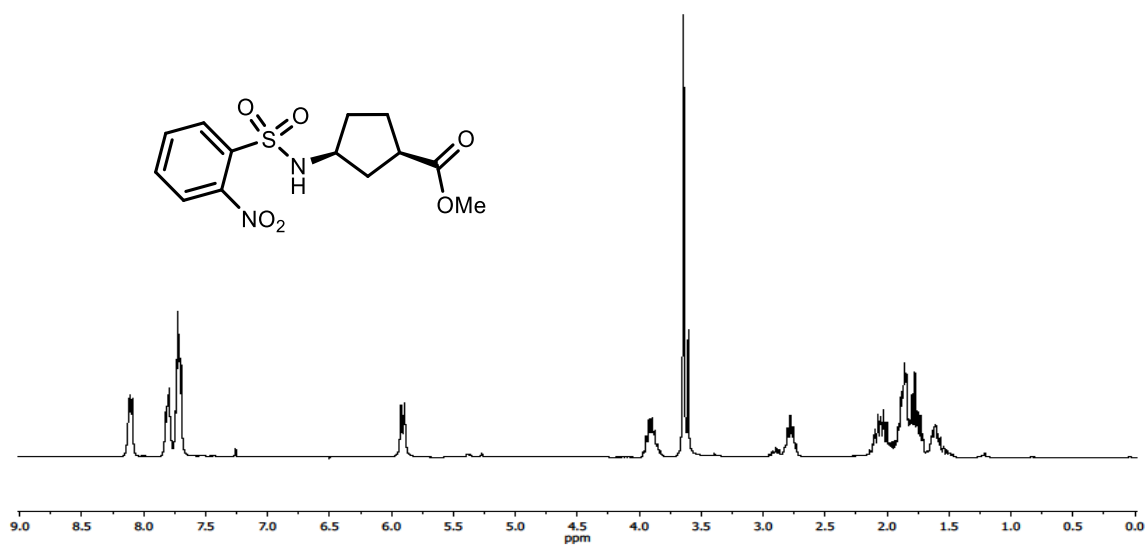


Anexo: Espectros de RMN y FT-IR

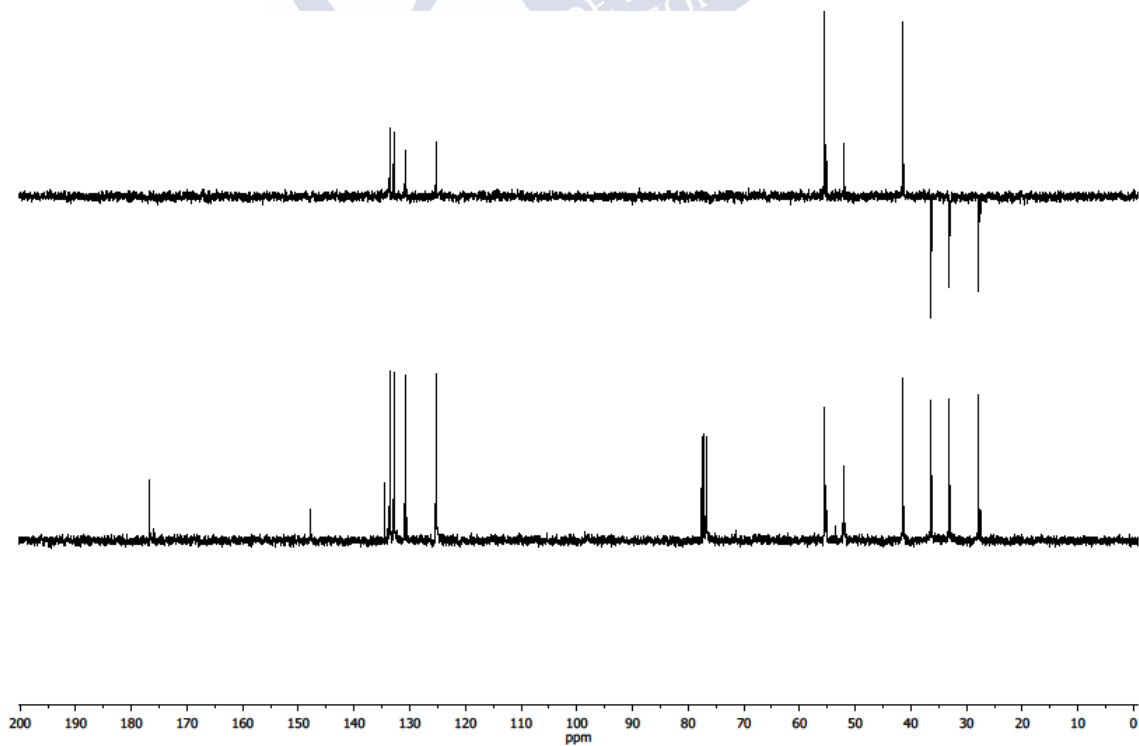
Capítulo I

Ns-*L*-Acp-OMe (4)

^1H RMN (40 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz)

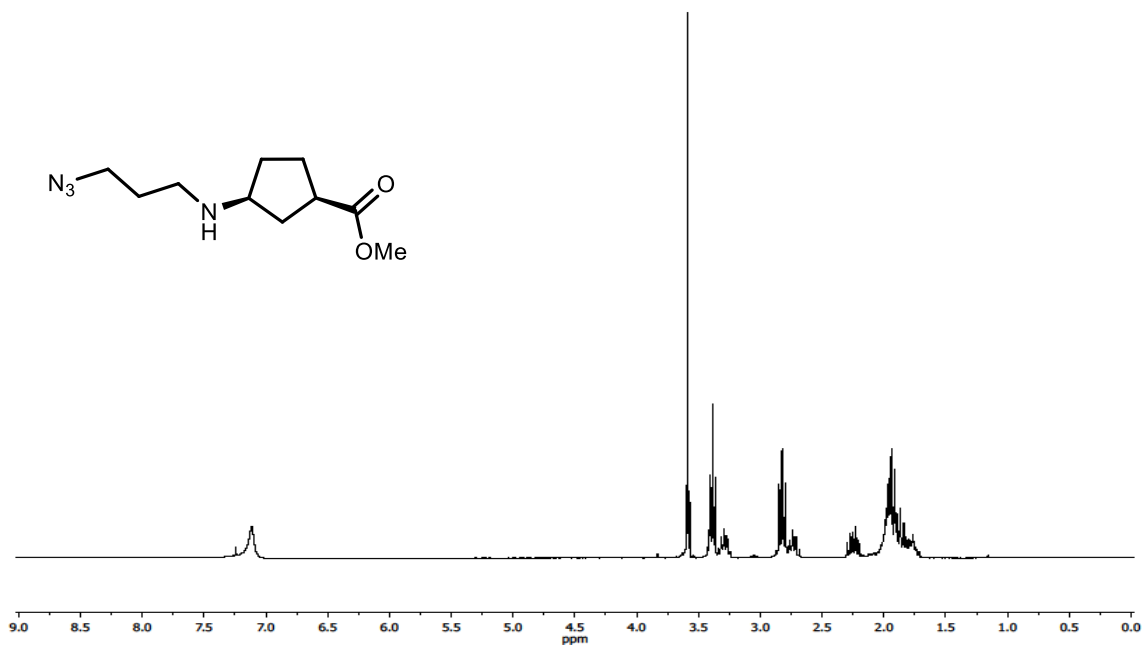


^{13}C y DEPT (50 mM en CDCl_3 , 298 K, 75 MHz)

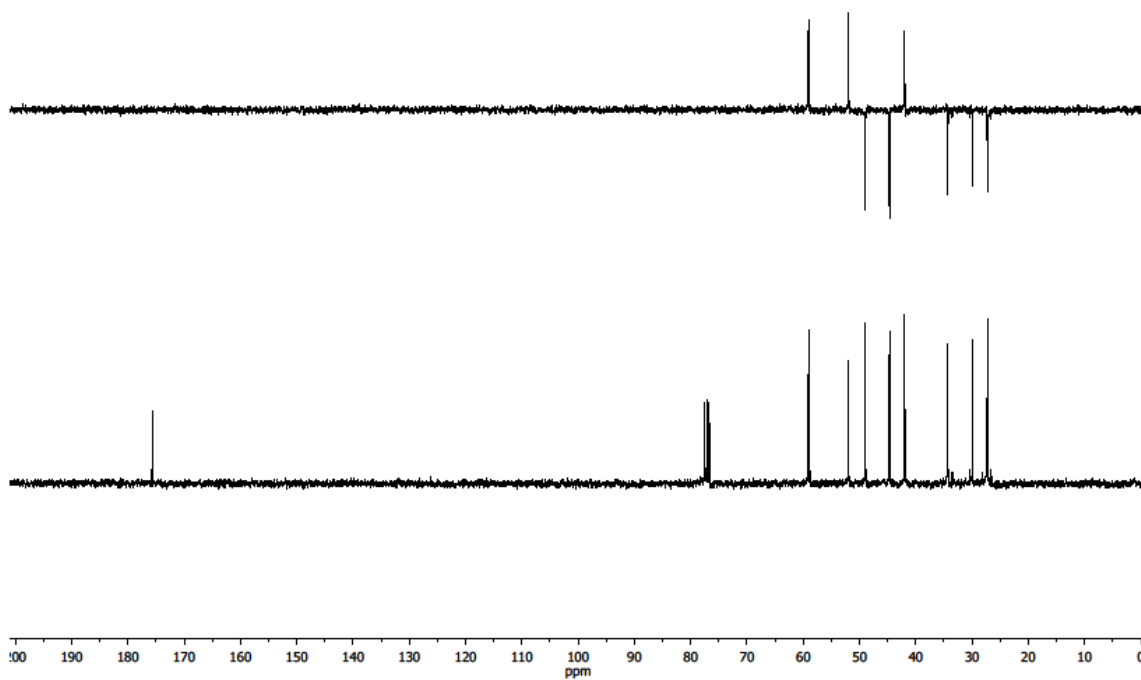


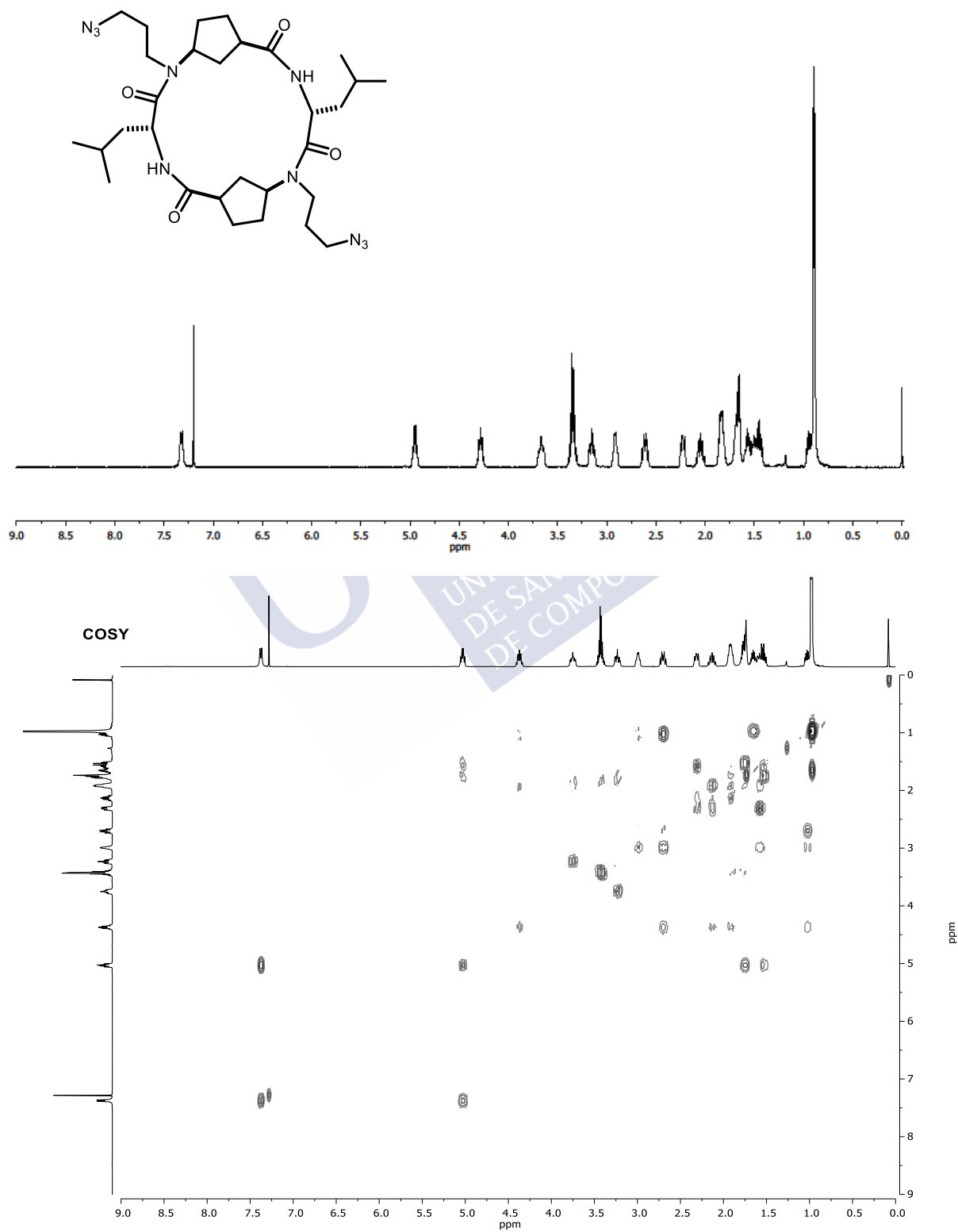
$C^{3N^3}N$ -L- γ -Acp-OMe (Aa1)

1H RMN (50 mM en $CDCl_3$, 298 K, 300 MHz)

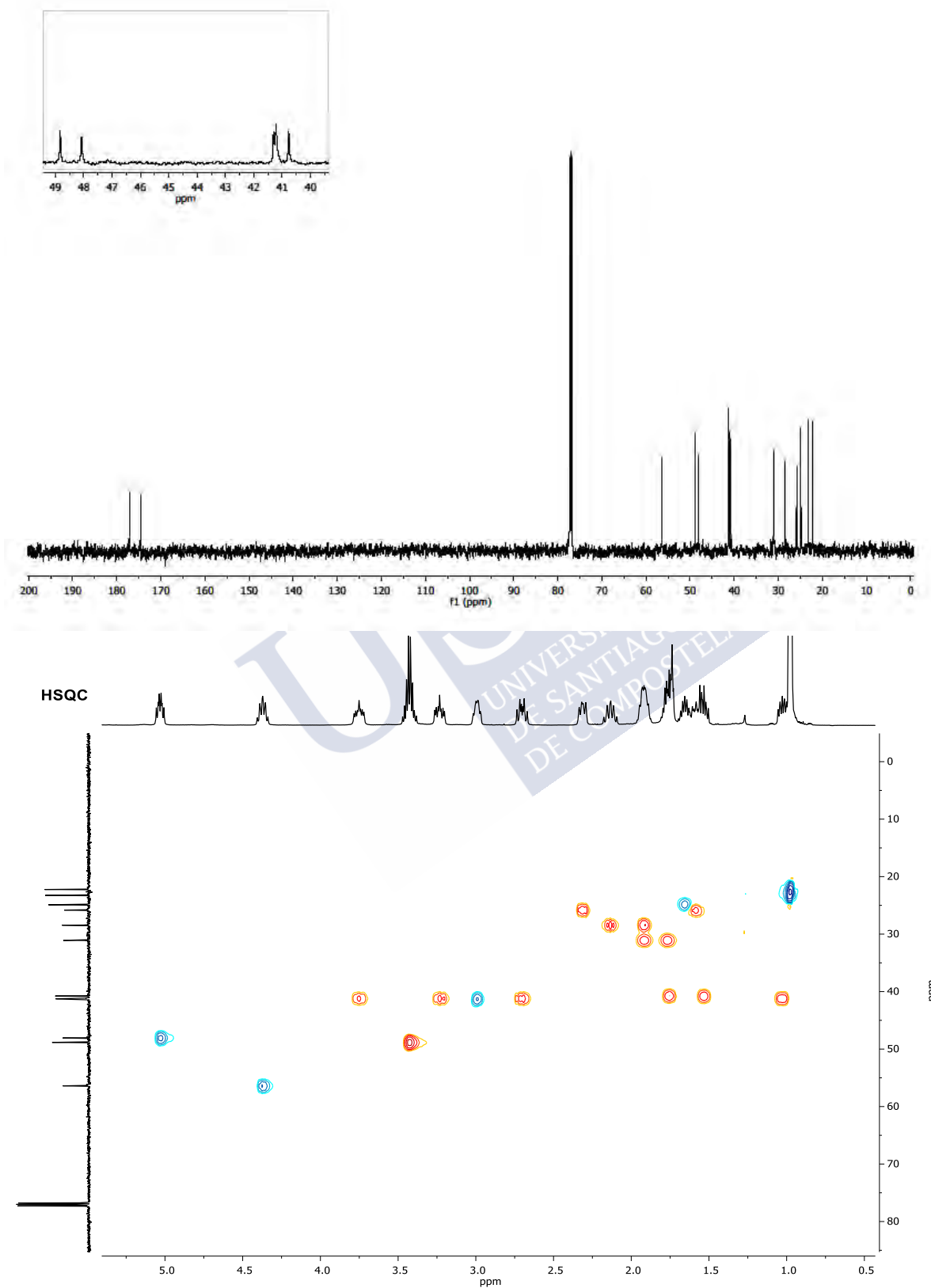


^{13}C y DEPT (50 mM en $CDCl_3$, 298 K, 75 MHz)

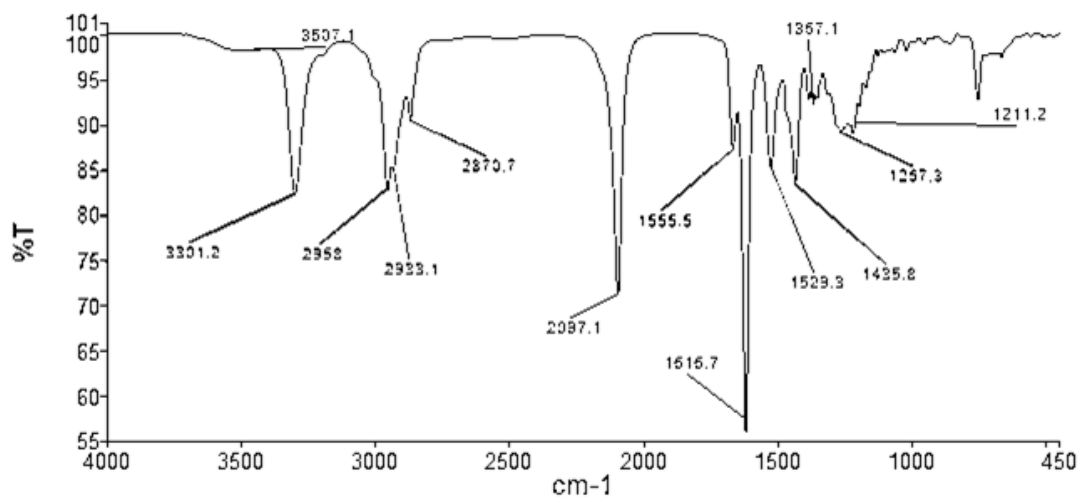


***c*-[(*D*-Leu-^{C3N3}*N*-*L*-Acp)₂] (CP1)**¹H y COSY (25 mM en CDCl₃, 298 K, 500 MHz)

^{13}C y HSQC (25 mM en CDCl_3 , 298 K, 125 MHz)

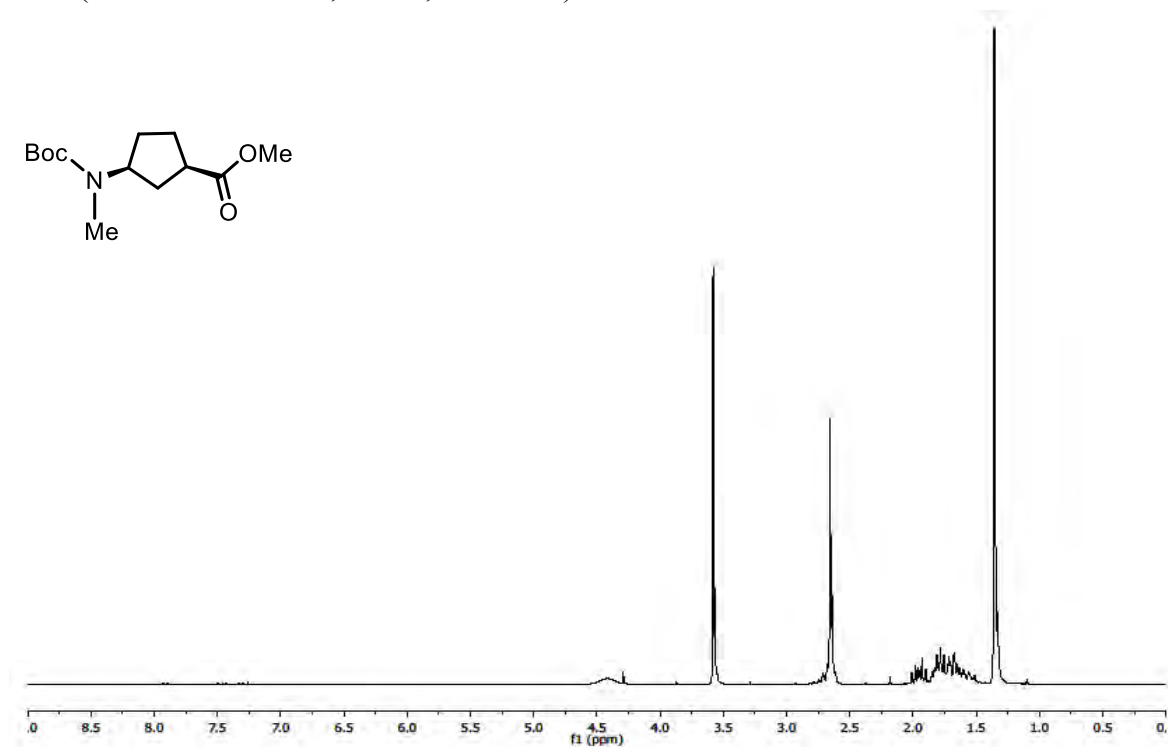


FT-IR (Neat, 298 K)

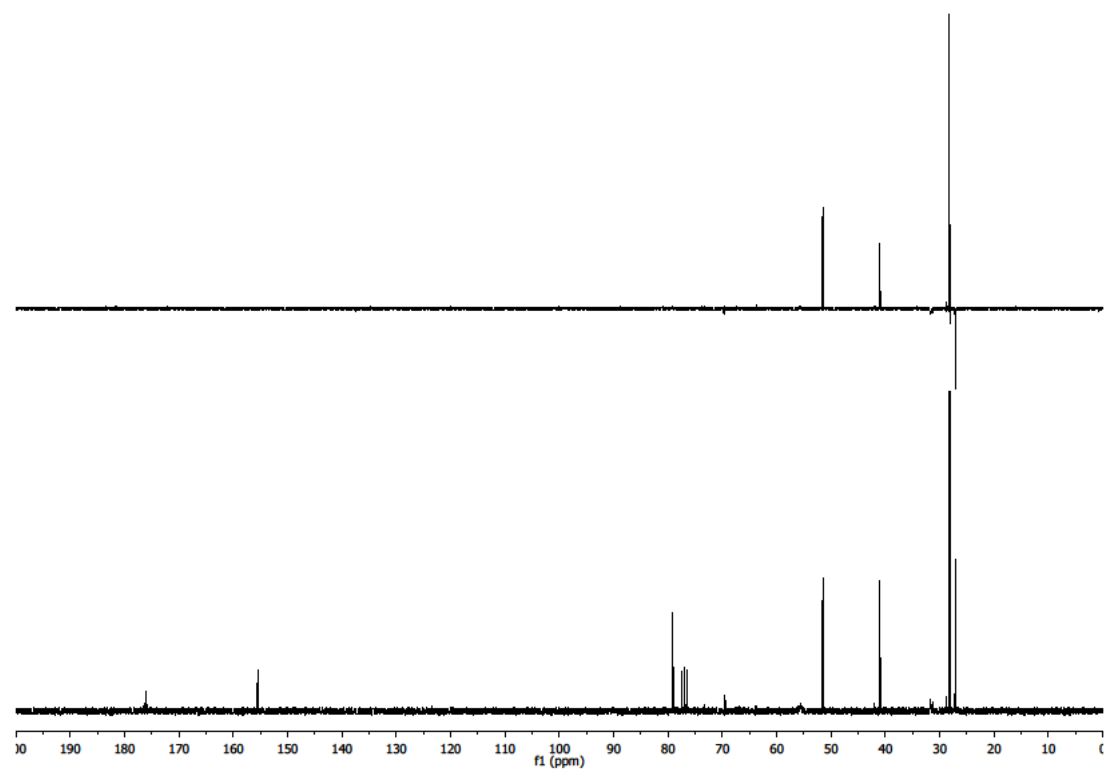


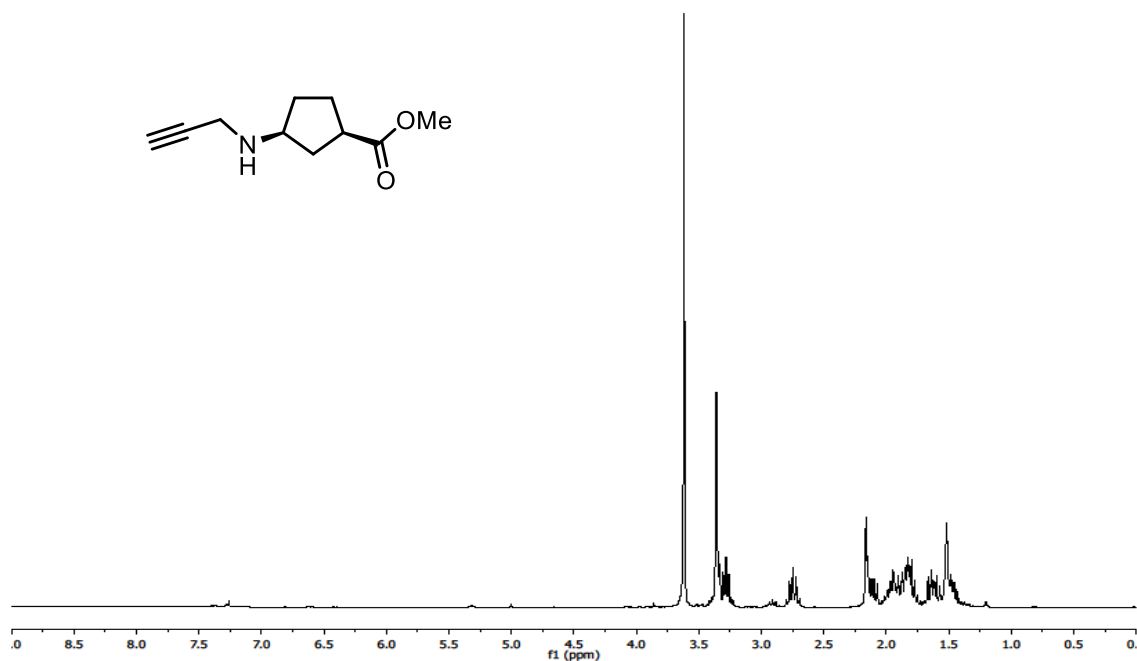
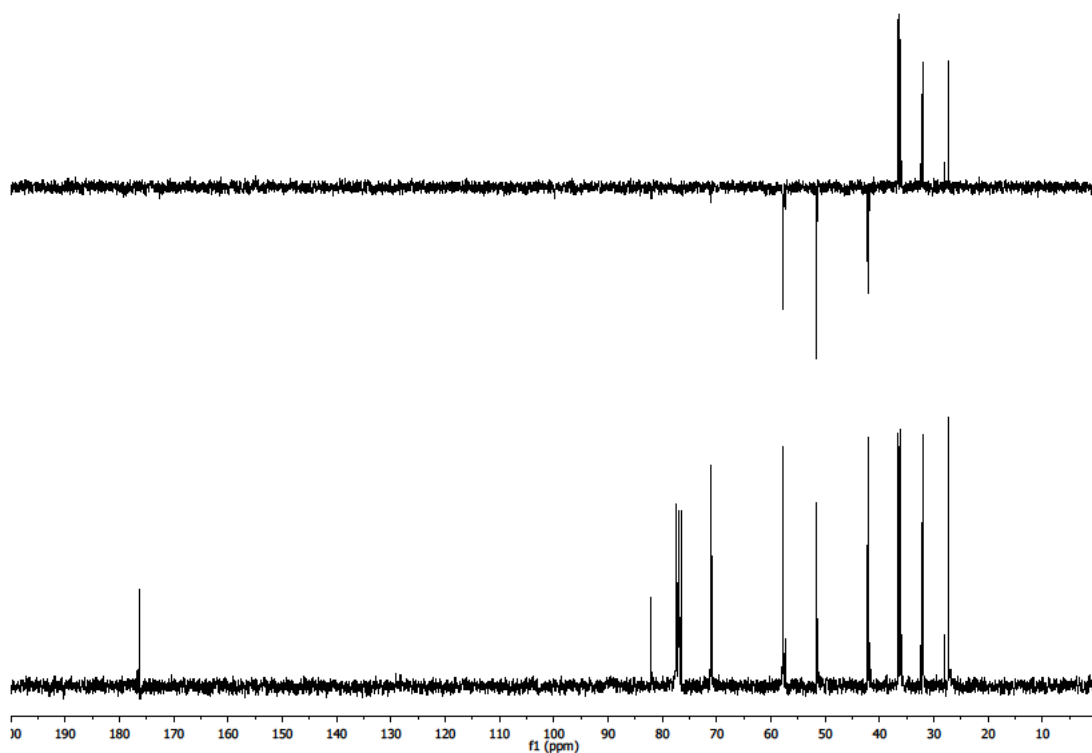
Boc-^{Me}N-L-Acp-OMe (Aa2)

¹H RMN (100 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)



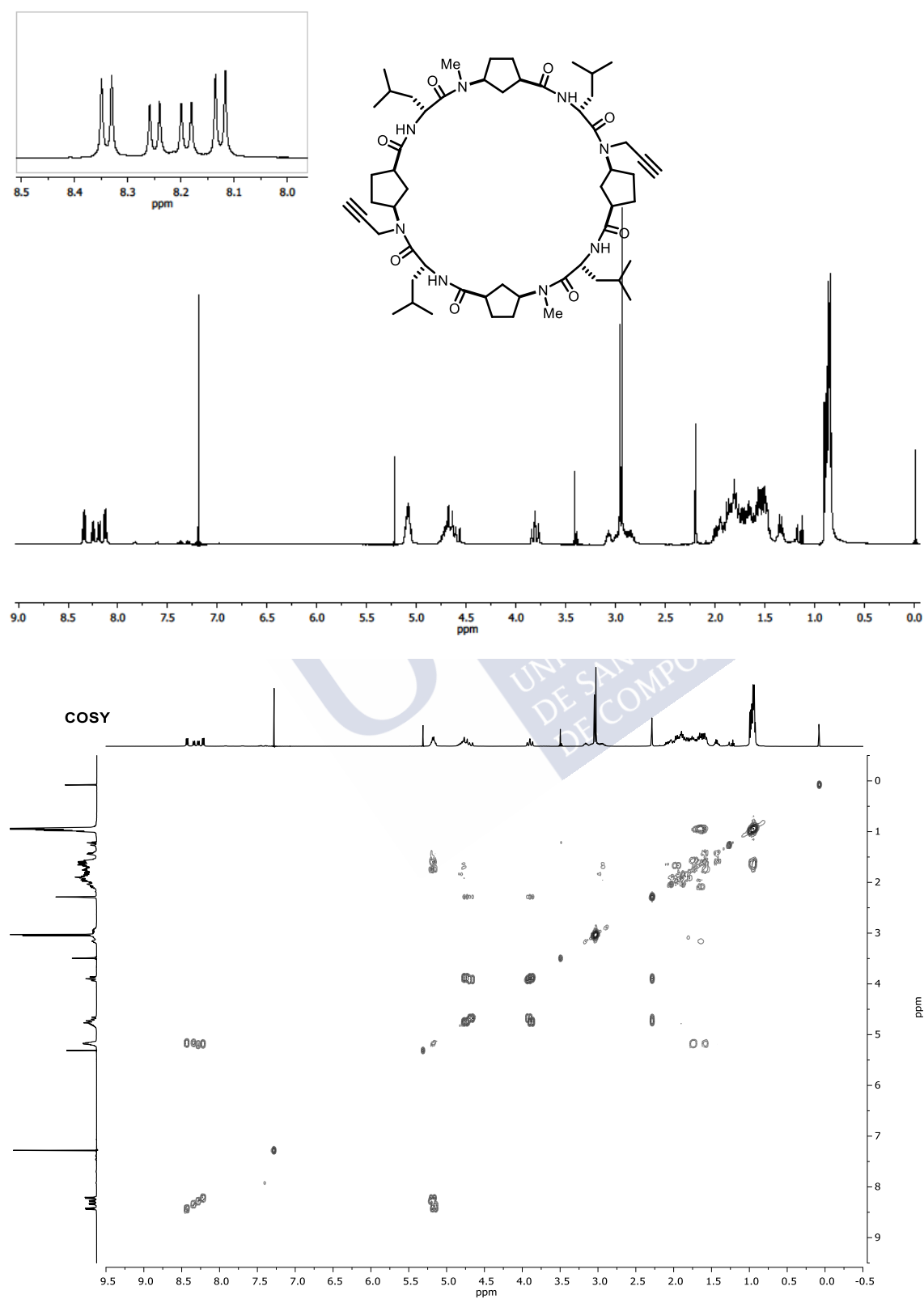
¹³C y DEPT (100 mM en CDCl₃, 298K, 75 MHz)

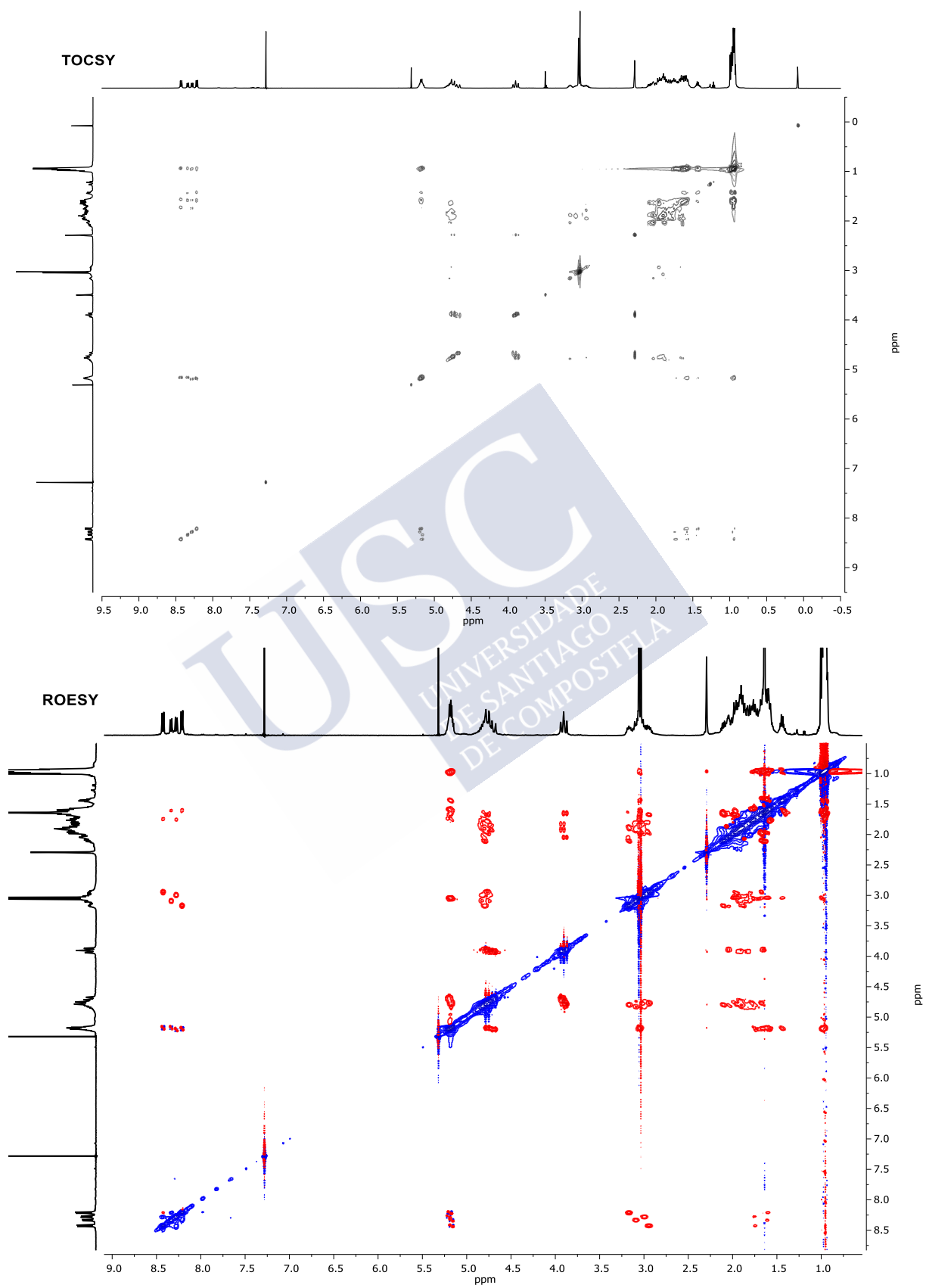


***prop*N-L-Acp-OMe (Aa3)**¹H RMN (90 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)¹³C y DEPT (65 mM en CDCl₃, 298 K, 75 MHz)

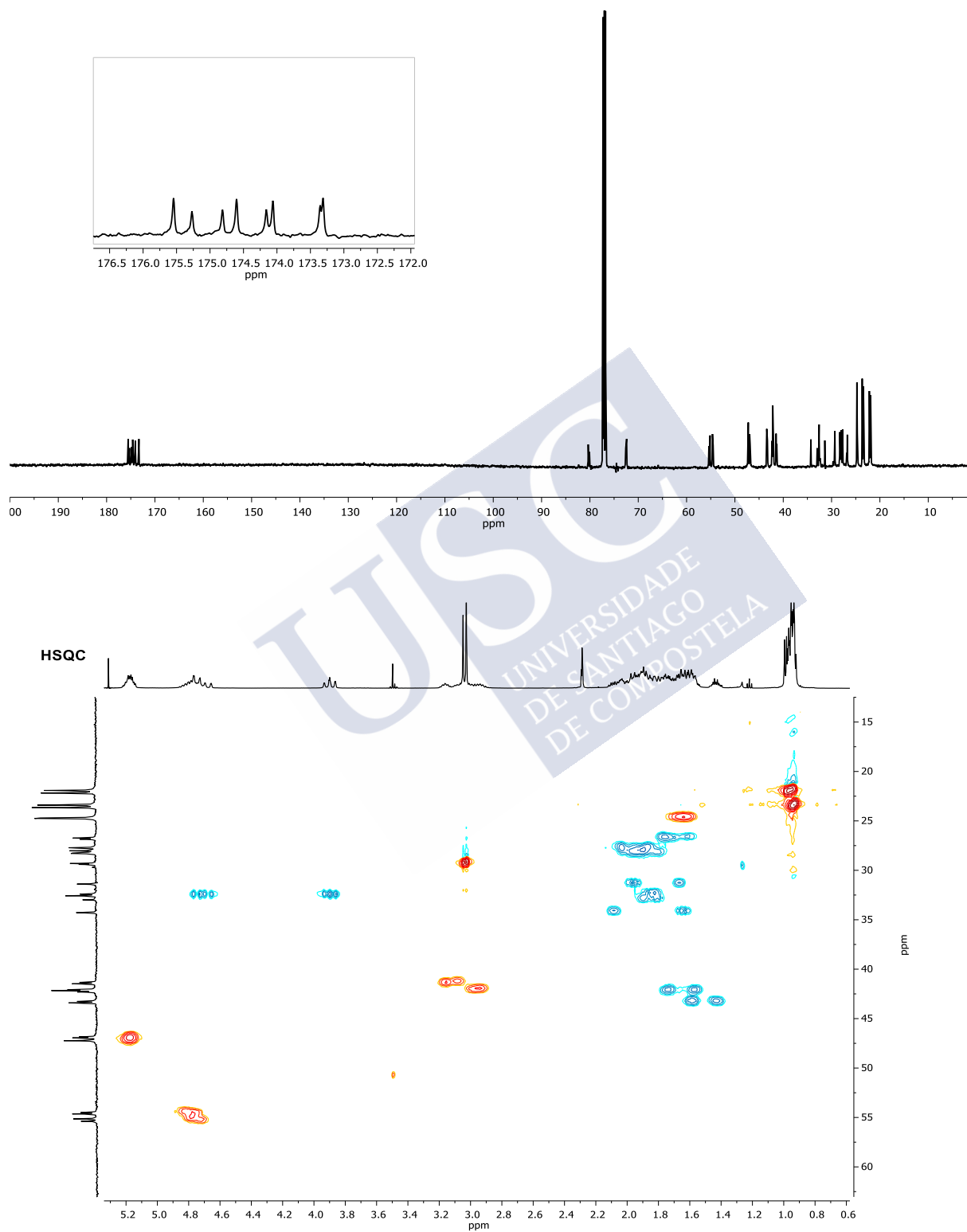
c-[(D-Leu-^{Me}N-L-Acp-D-Leu-^{prop}N-L-Acp)₂] (CP2)

¹H, COSY, TOCSY y ROESY (15 mM en CDCl₃, 298 K, 500 MHz)

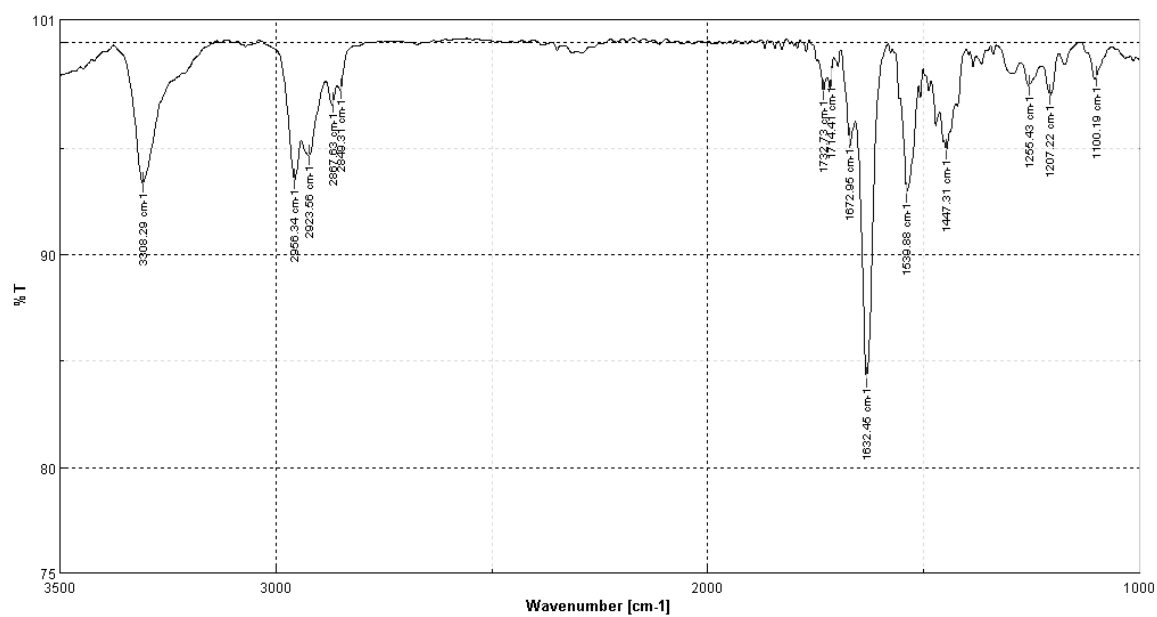




^{13}C y HSQC (25 mM en CDCl_3 , 298 K, 125 MHz)

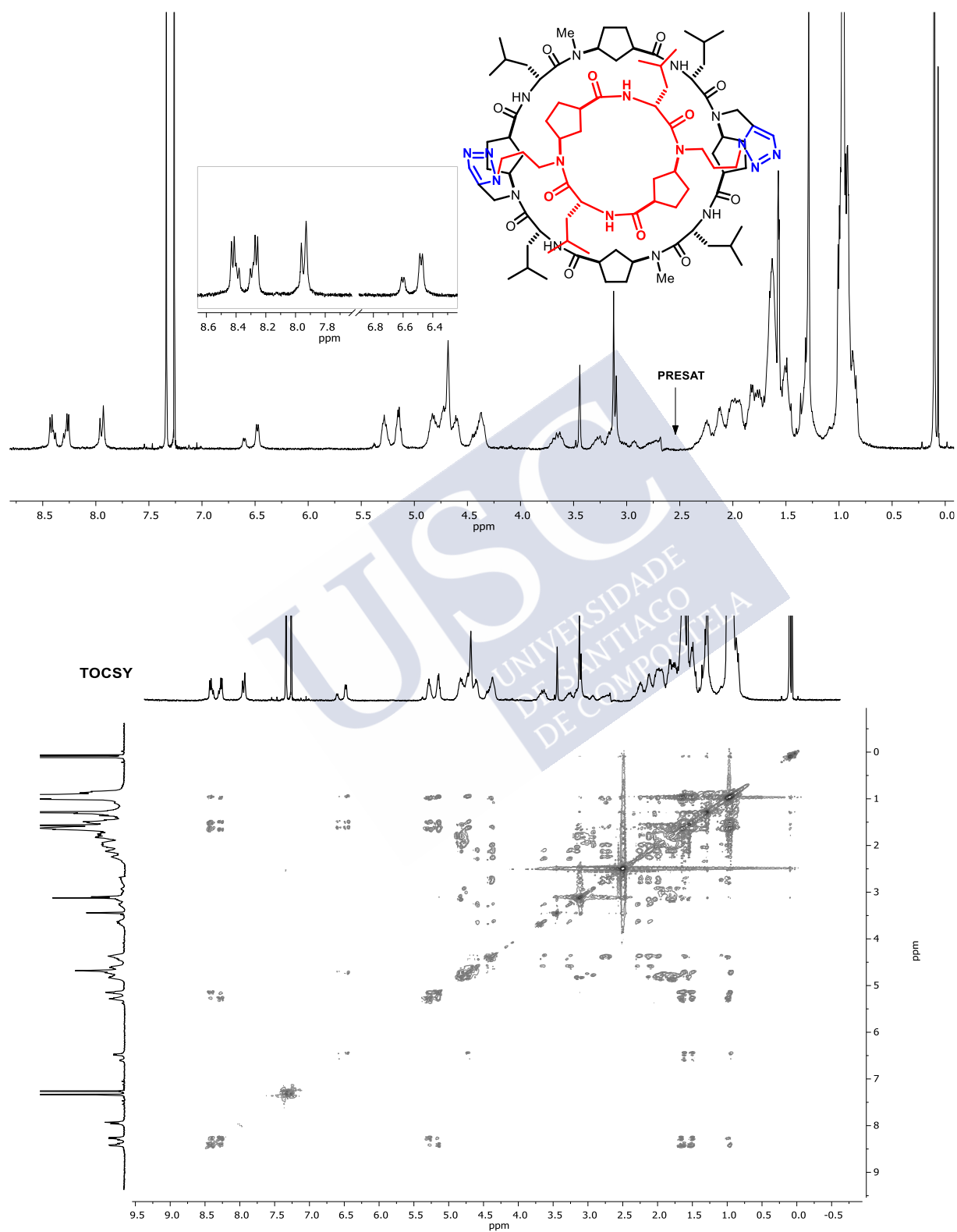


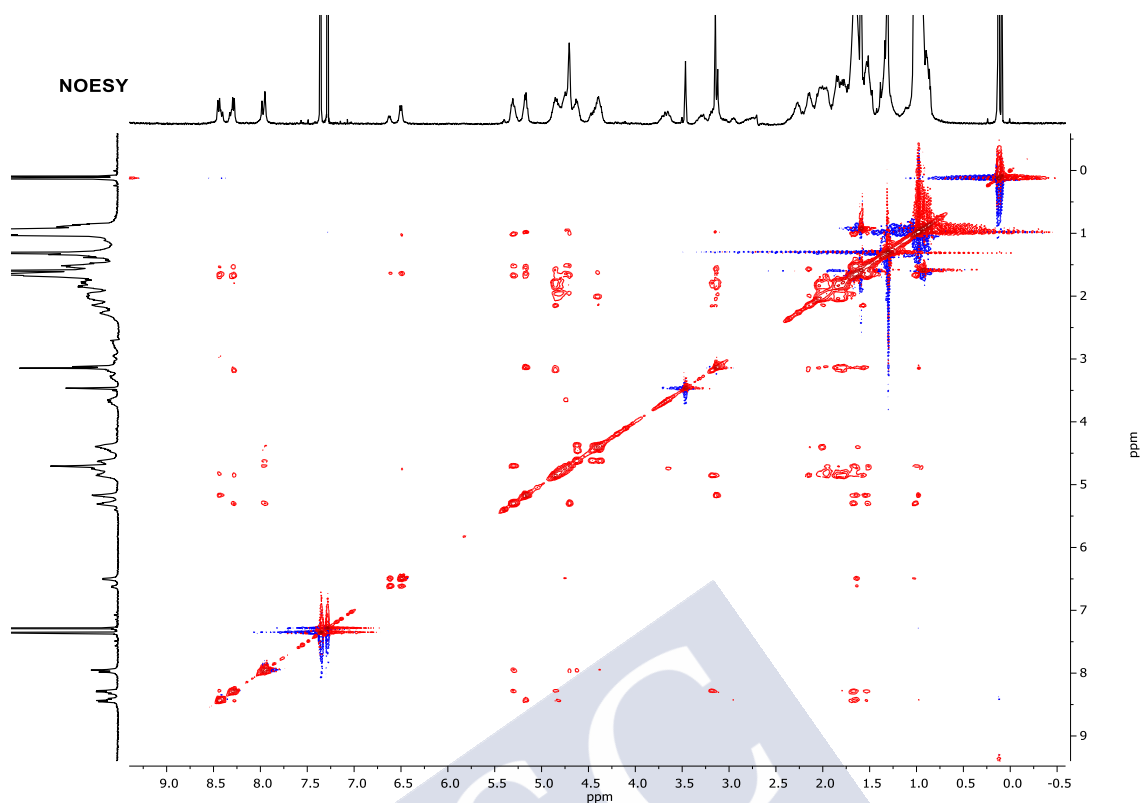
FT-IR (neat, 298 K)



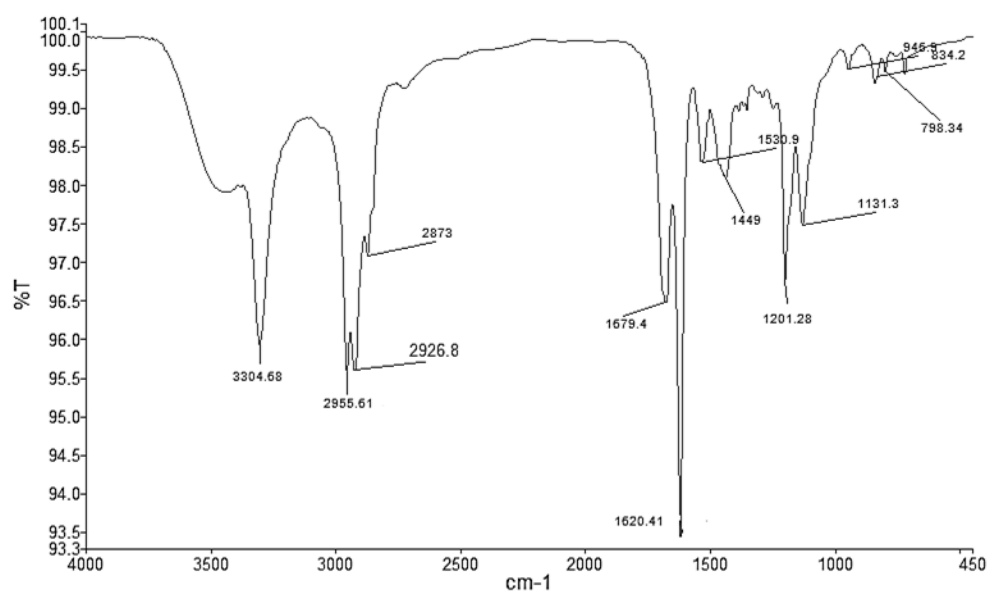
Bis-ciclopéptido covalente CP3

^1H , COSY, TOCSY y NOESY (5 mM en 2% MeOH d_3/CDCl_3 , 298 K, 500 MHz)



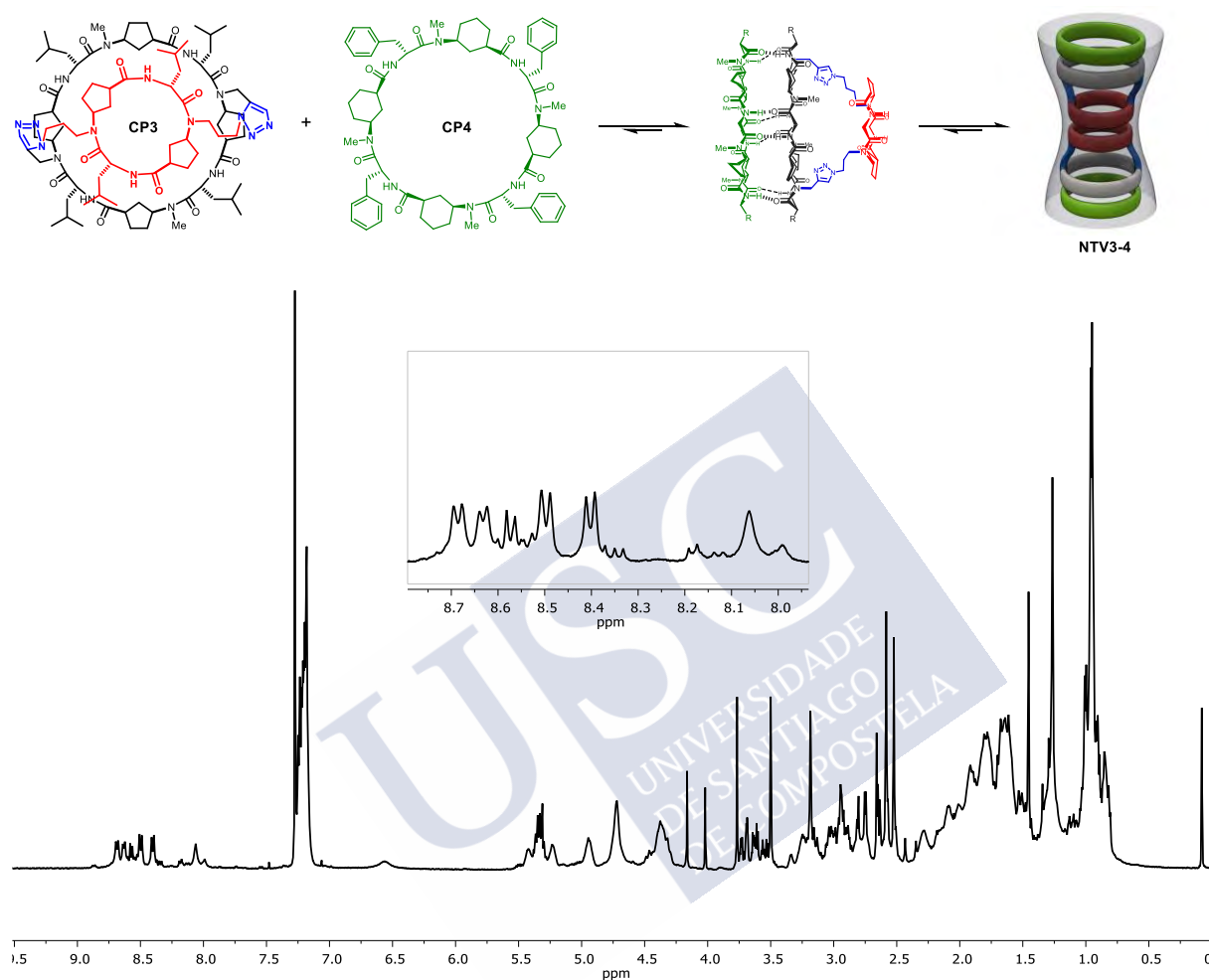


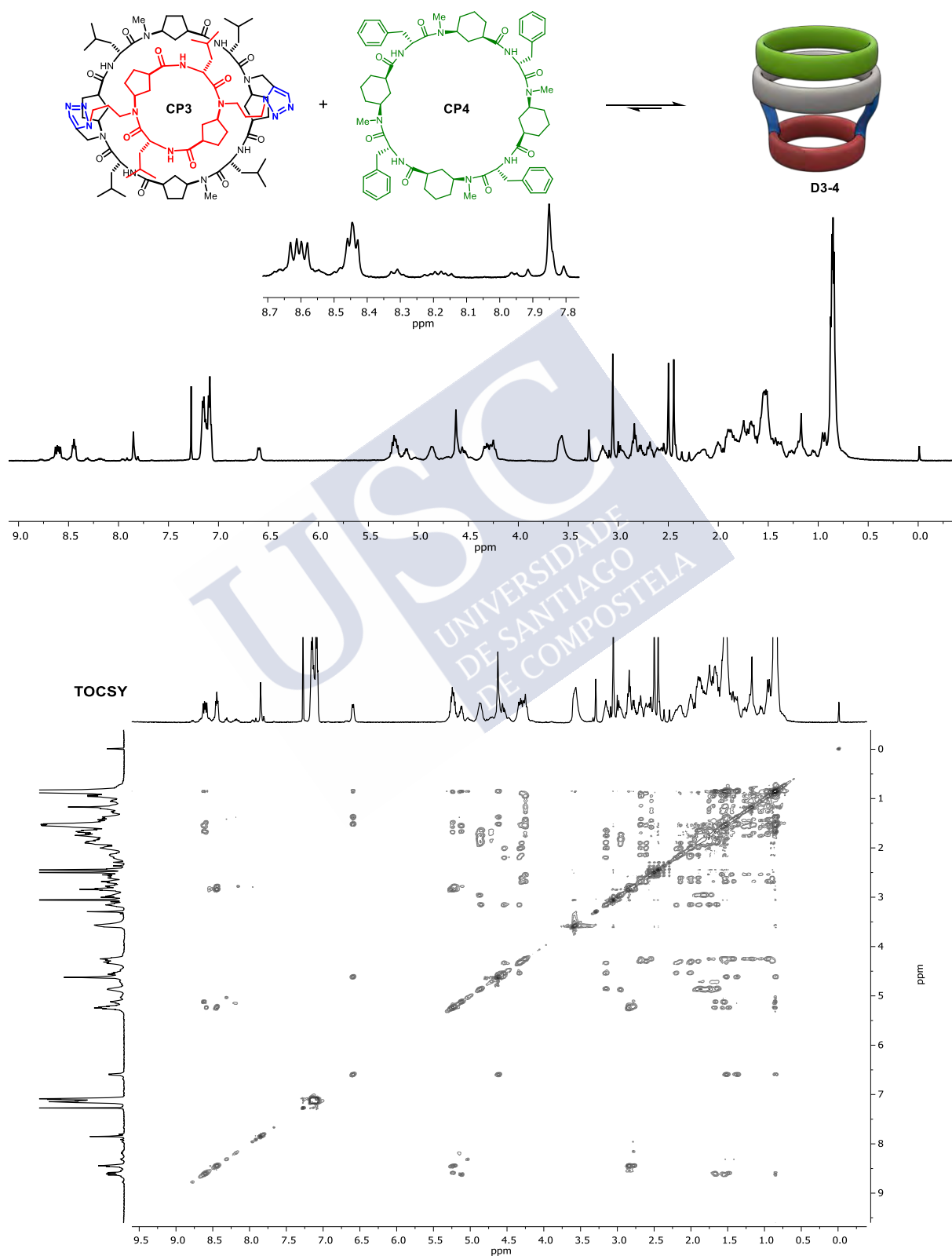
FT-IR (CaF₂, 298 K)

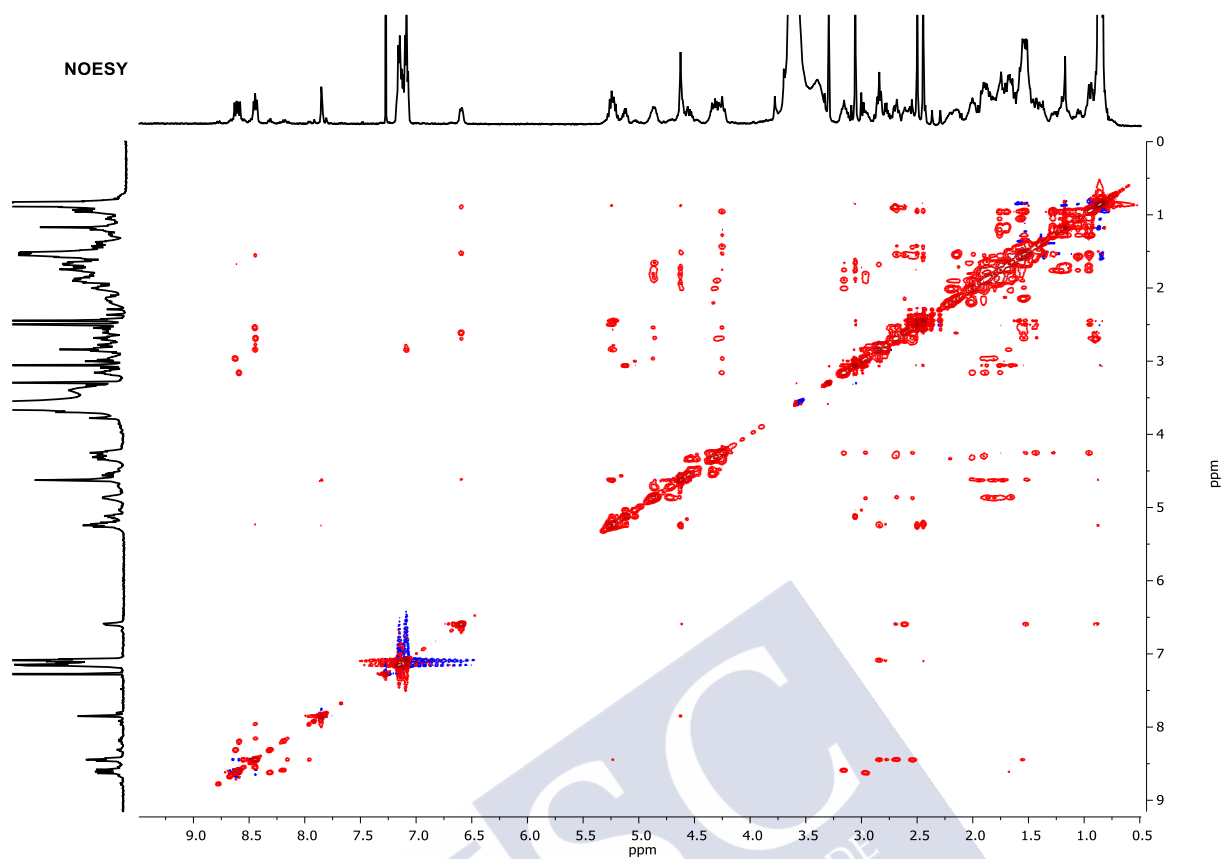


Heterodímero CP3-CP4 (1:1, NTV3-4)

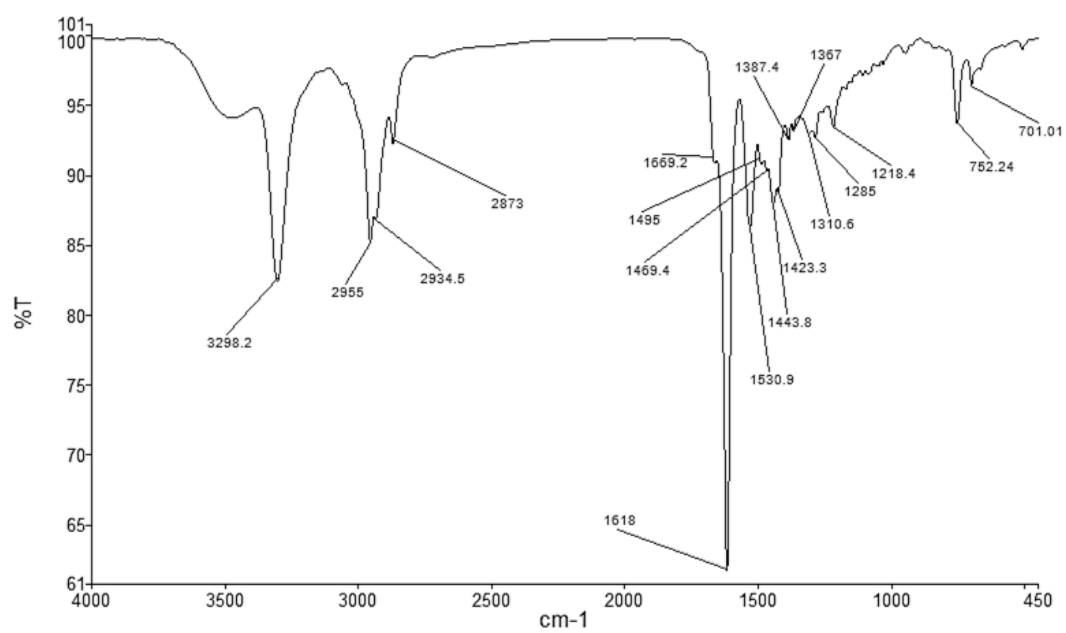
^1H RMN (7 mM en CDCl_3 , 298 K, 500 MHz)



Heterodímero CP3-CP4 (1:1, D3-4) ^1H RMN (10 mM en 1% MeOH d_3/CDCl_3 , 298 K, 500 MHz)



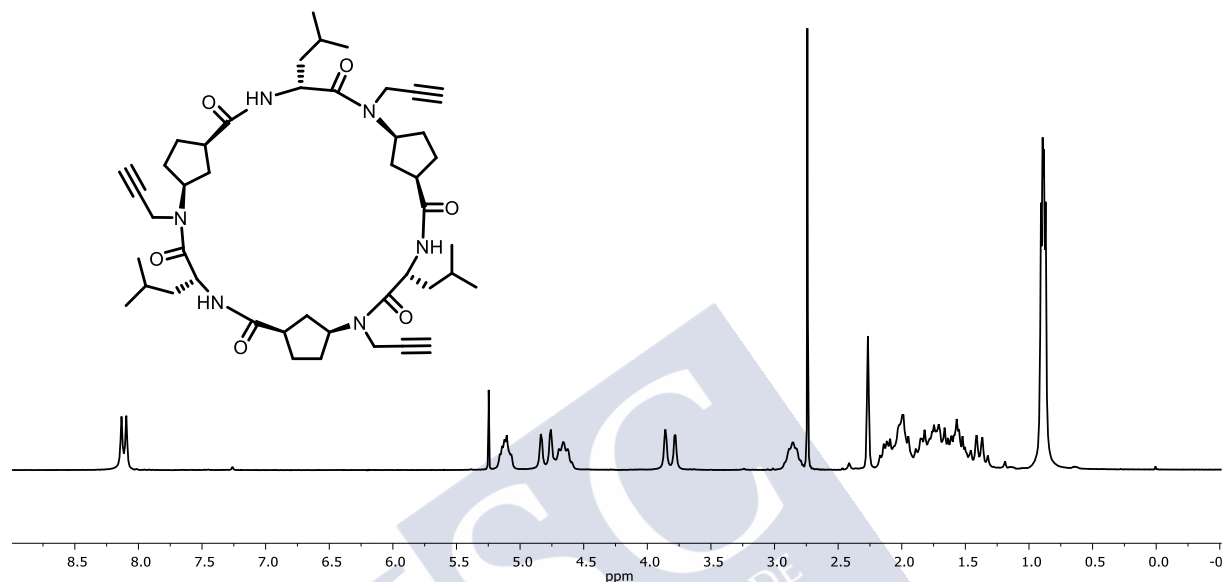
FT-IR (CaF₂, 298 K)



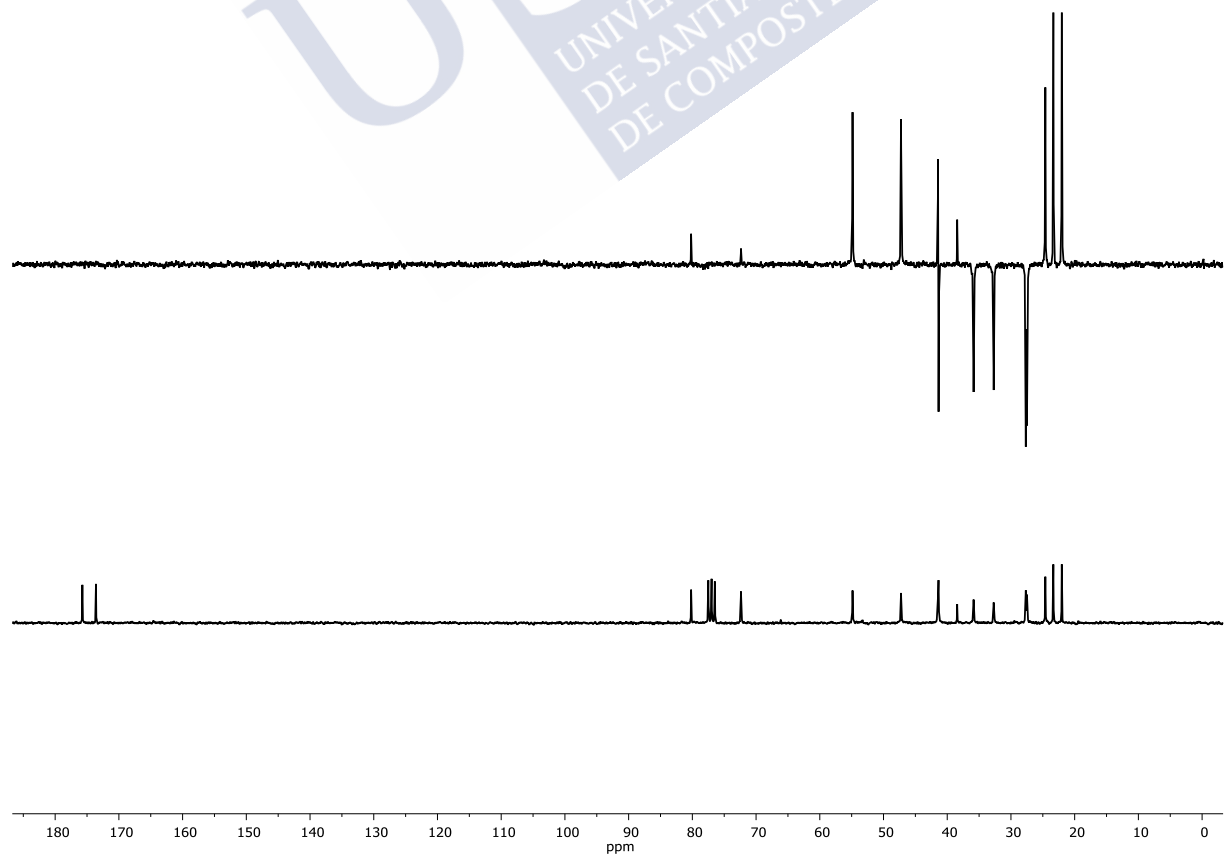
Capítulo II

c-[(*D*-Leu^{prop}*N*-*L*-Acp)]₃ (CP5)

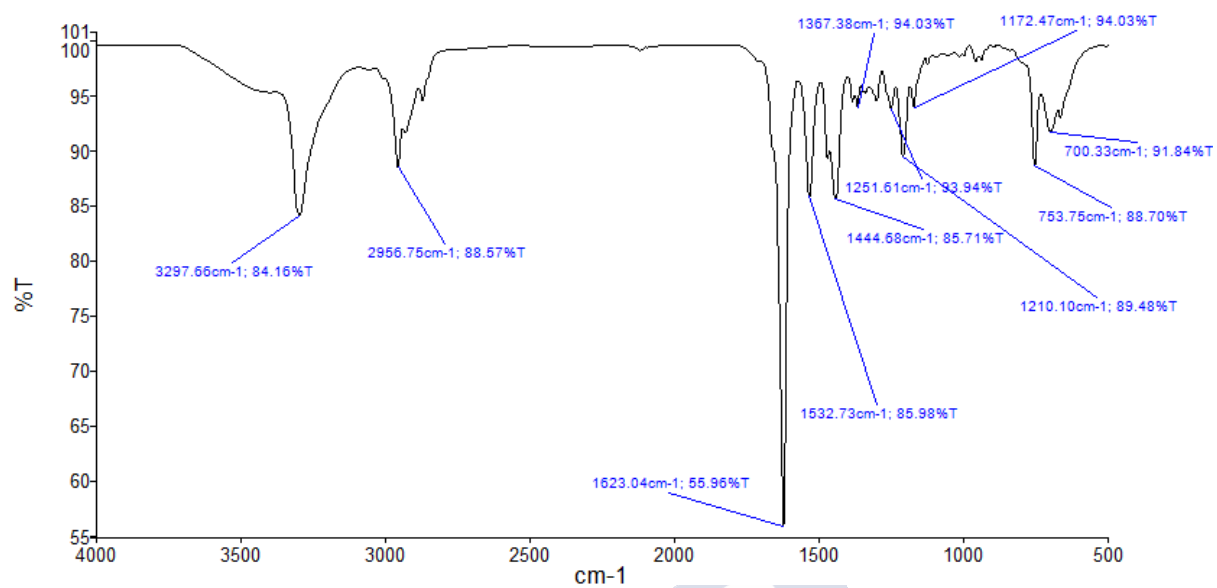
¹H RMN (50 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)

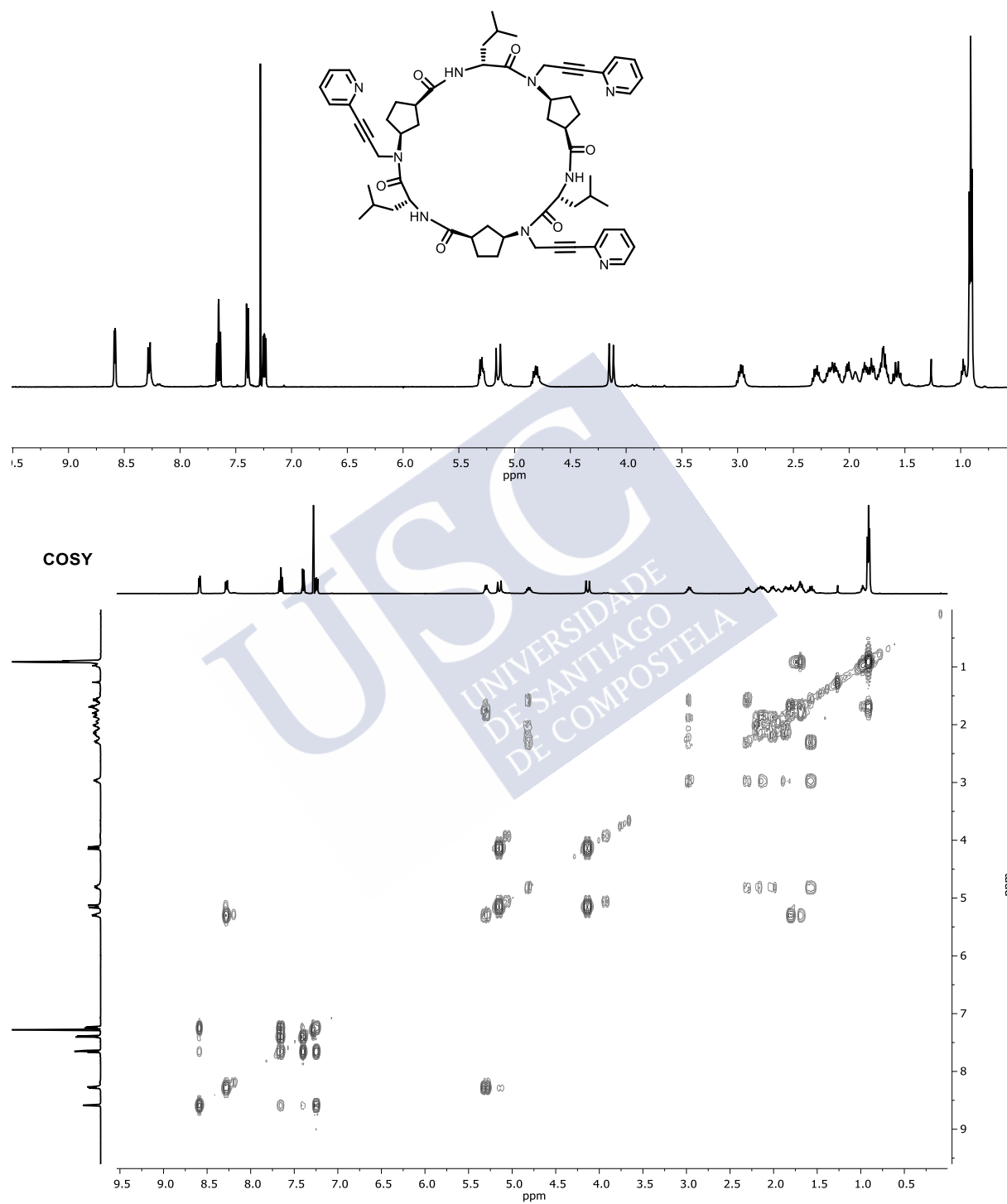


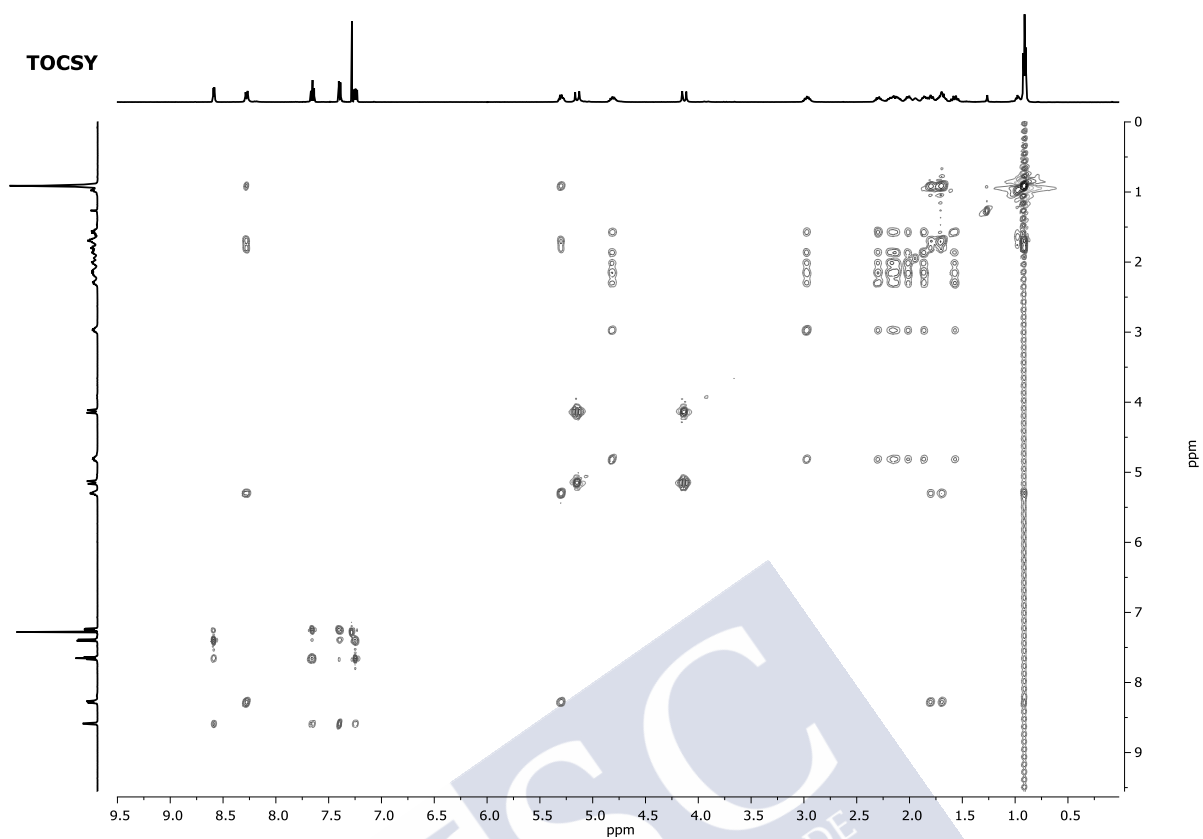
¹³C y DEPT (50 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)



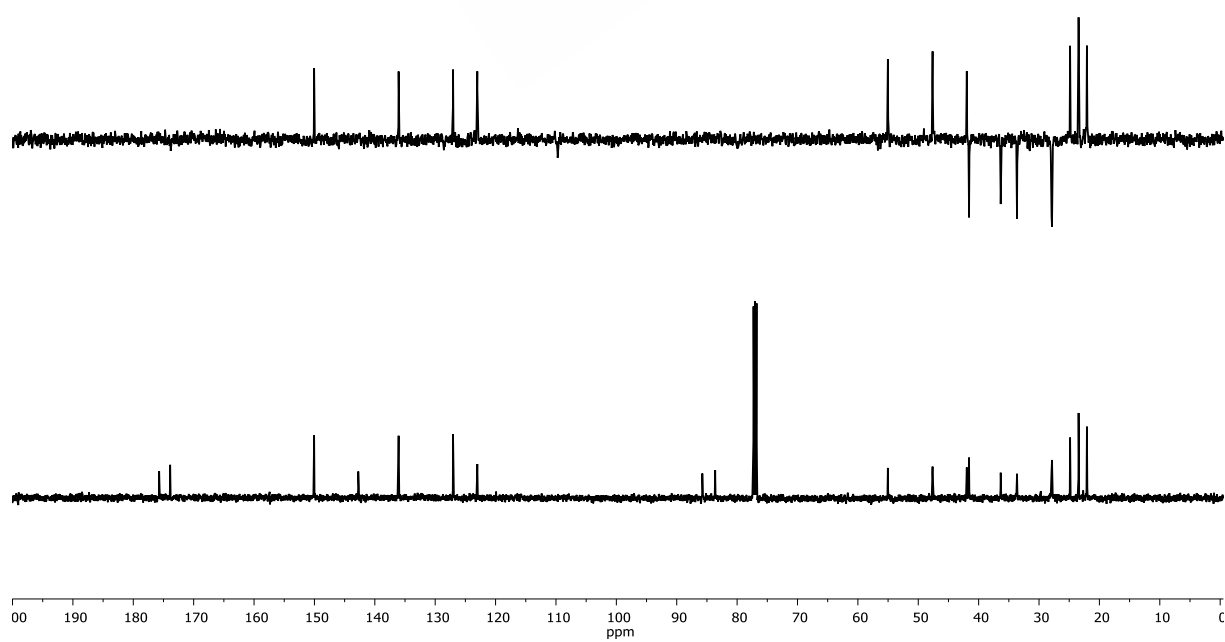
FT-IR (neat, 298 K)



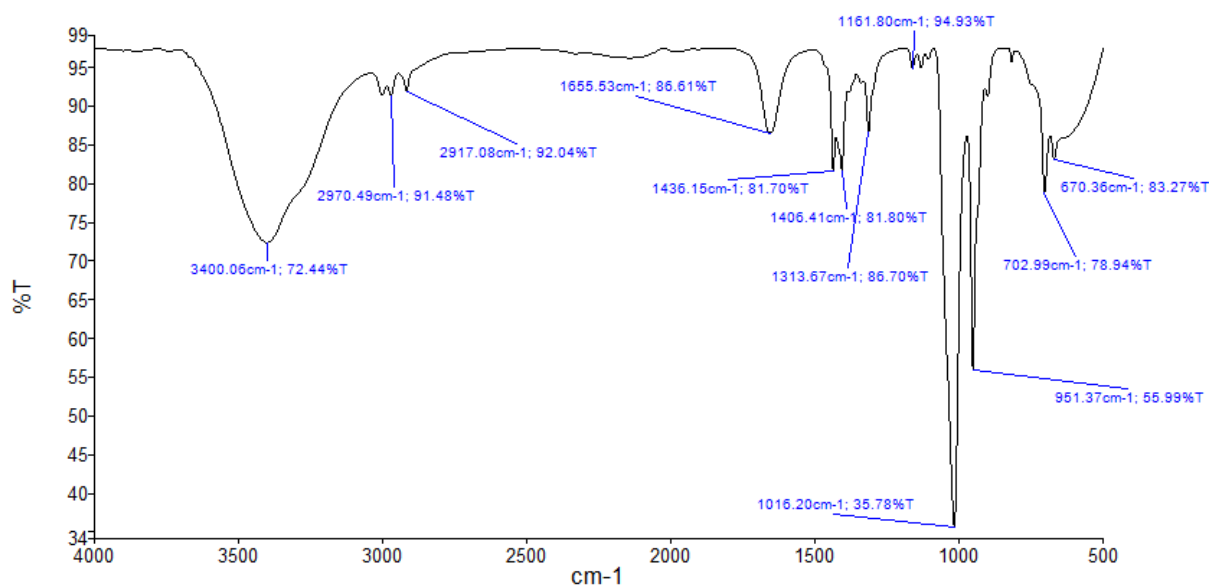
***c*-[(*D*-Leu-^{*py-o*}*N*-*L*-Acp)₃] (CP5a)**¹H RMN, COSY, TOCSY (8 mM en CDCl₃, 298 K, 500 MHz)



^{13}C y DEPT (8 mM en CDCl_3 , 298 K, 125 MHz)

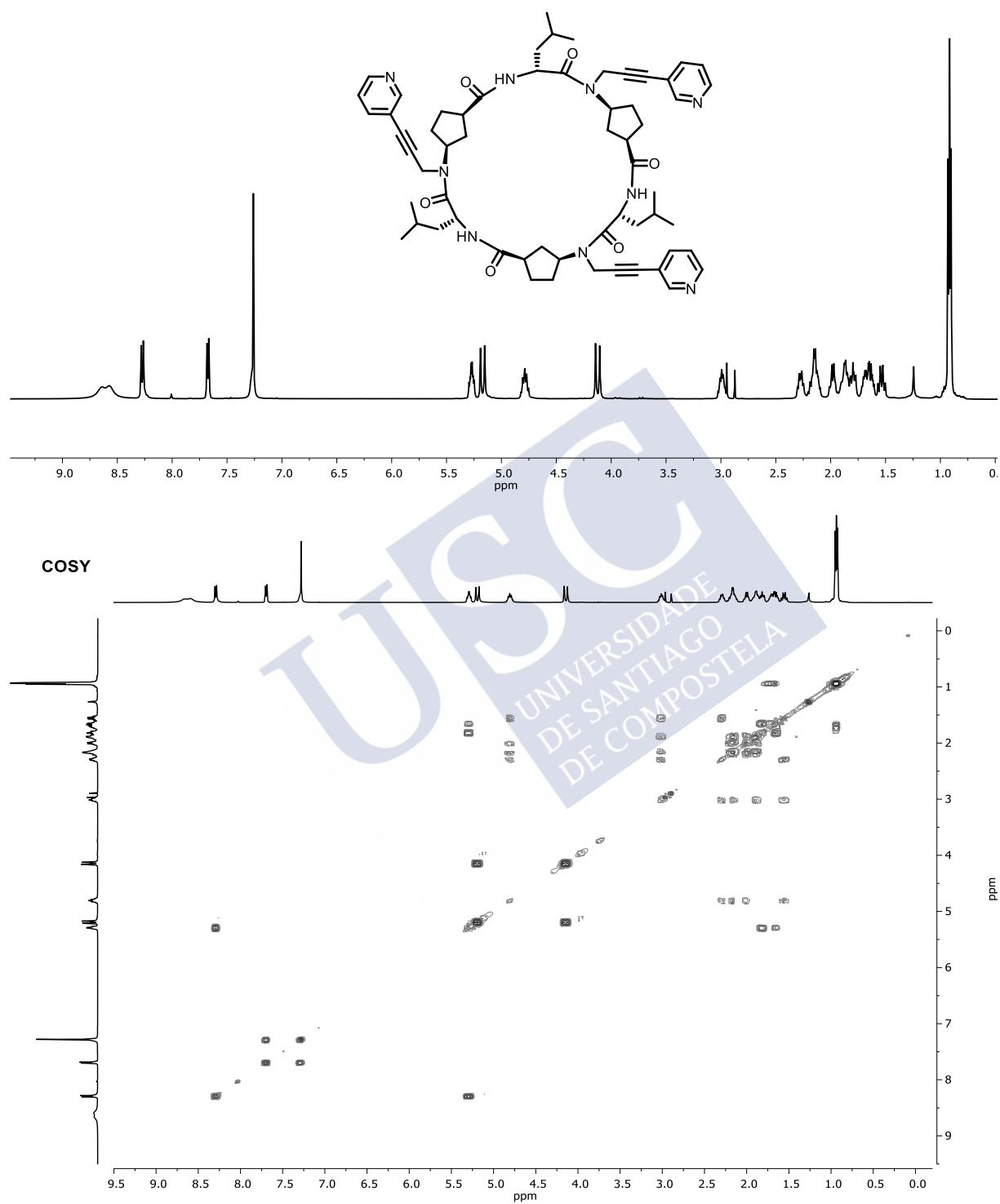


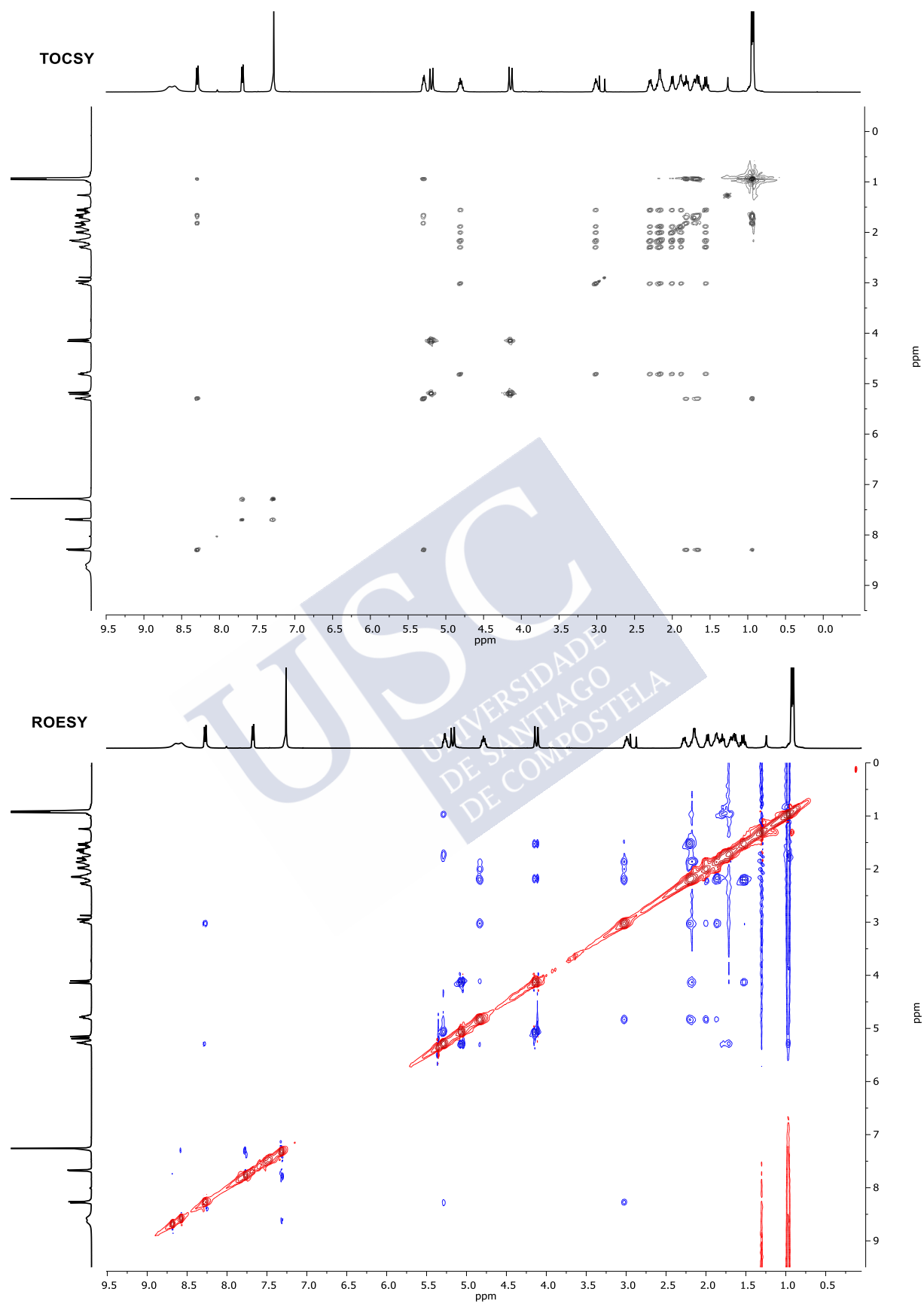
FT-IR (neat, 298 K)



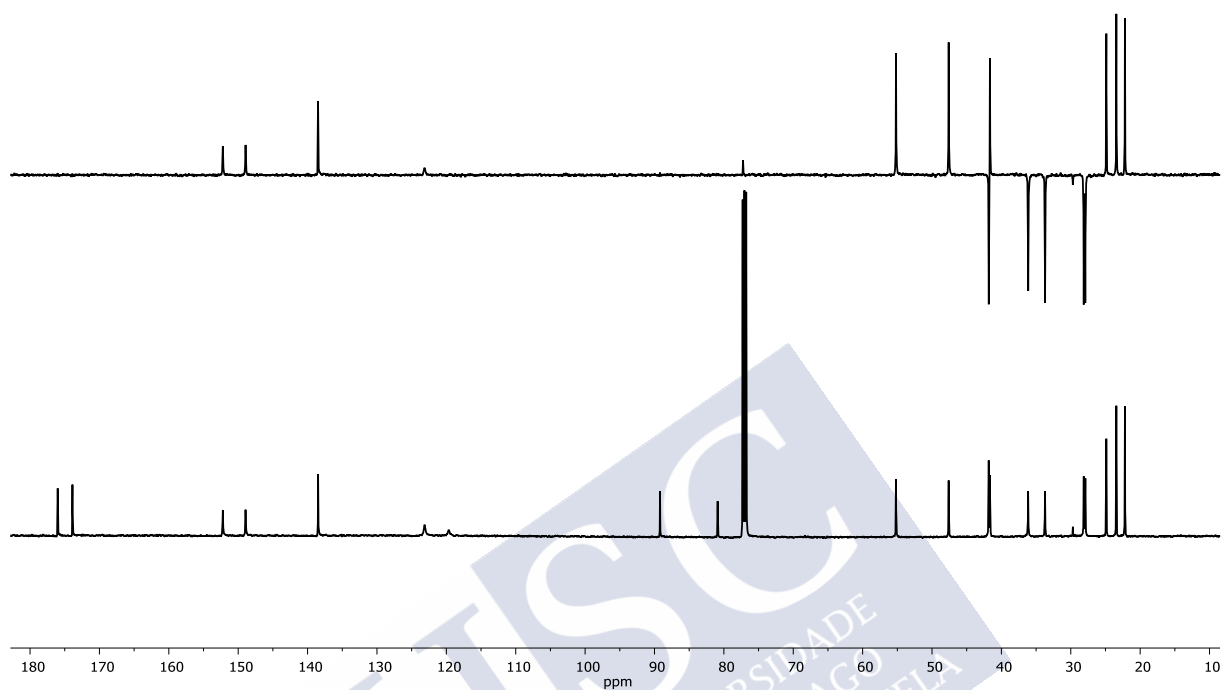
c-[(D-Leu-^{py-m}N-L-Acp)₃] (CP5b)

¹H RMN, COSY, TOCSY y ROESY (10 mM en CDCl₃, 298 K, 500 MHz)

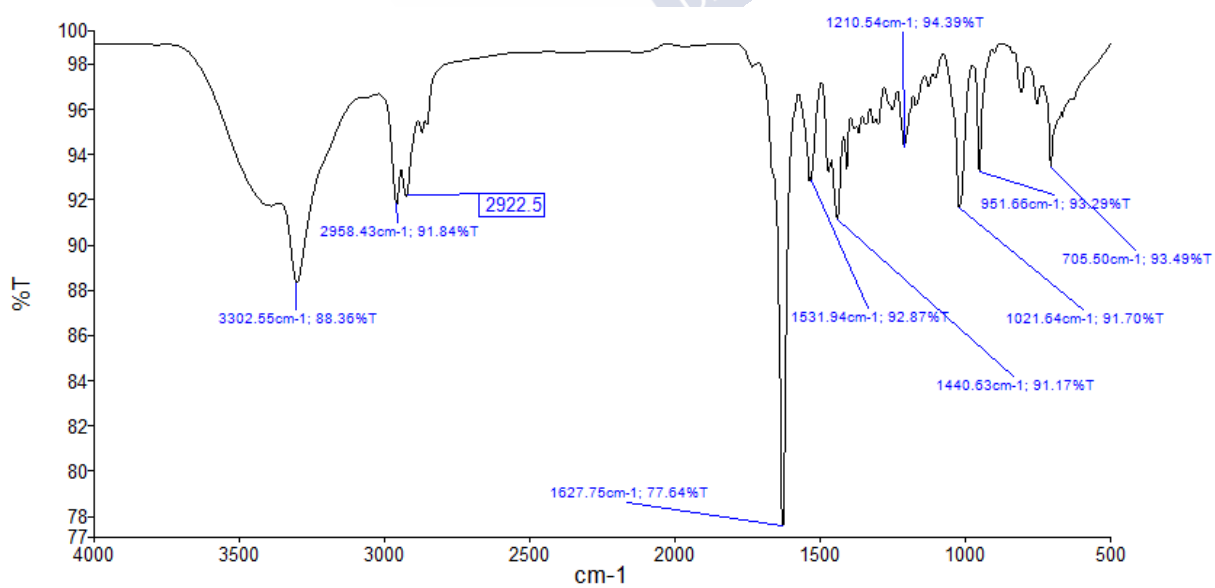


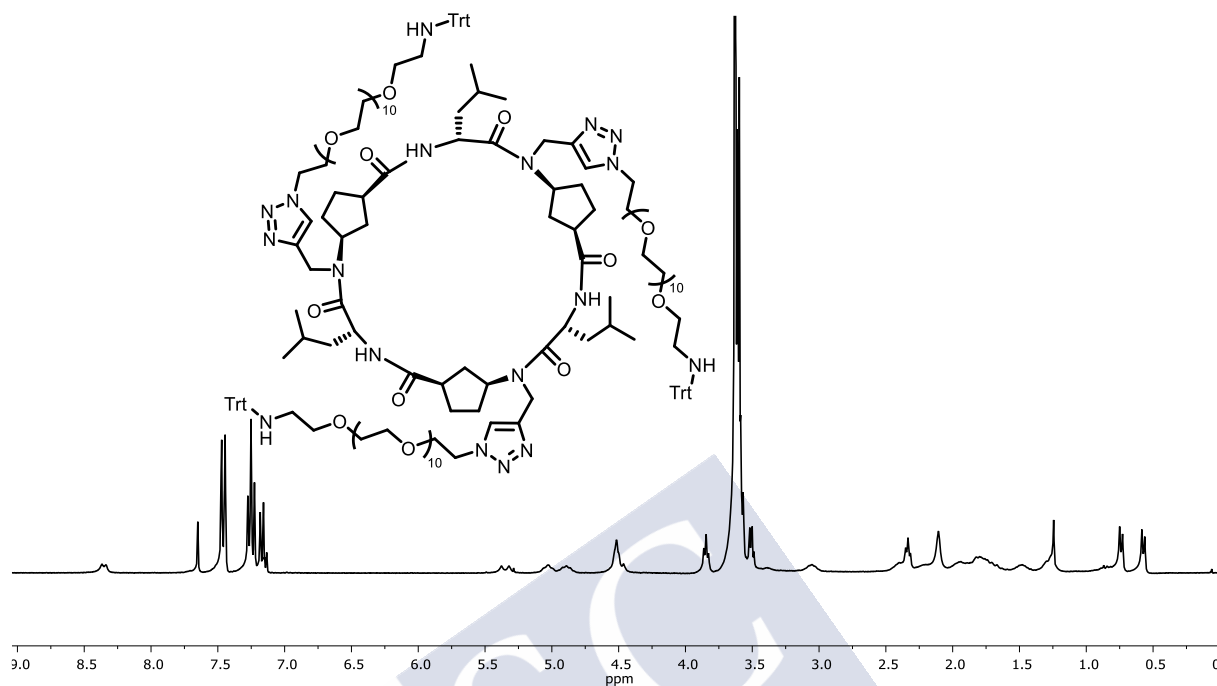
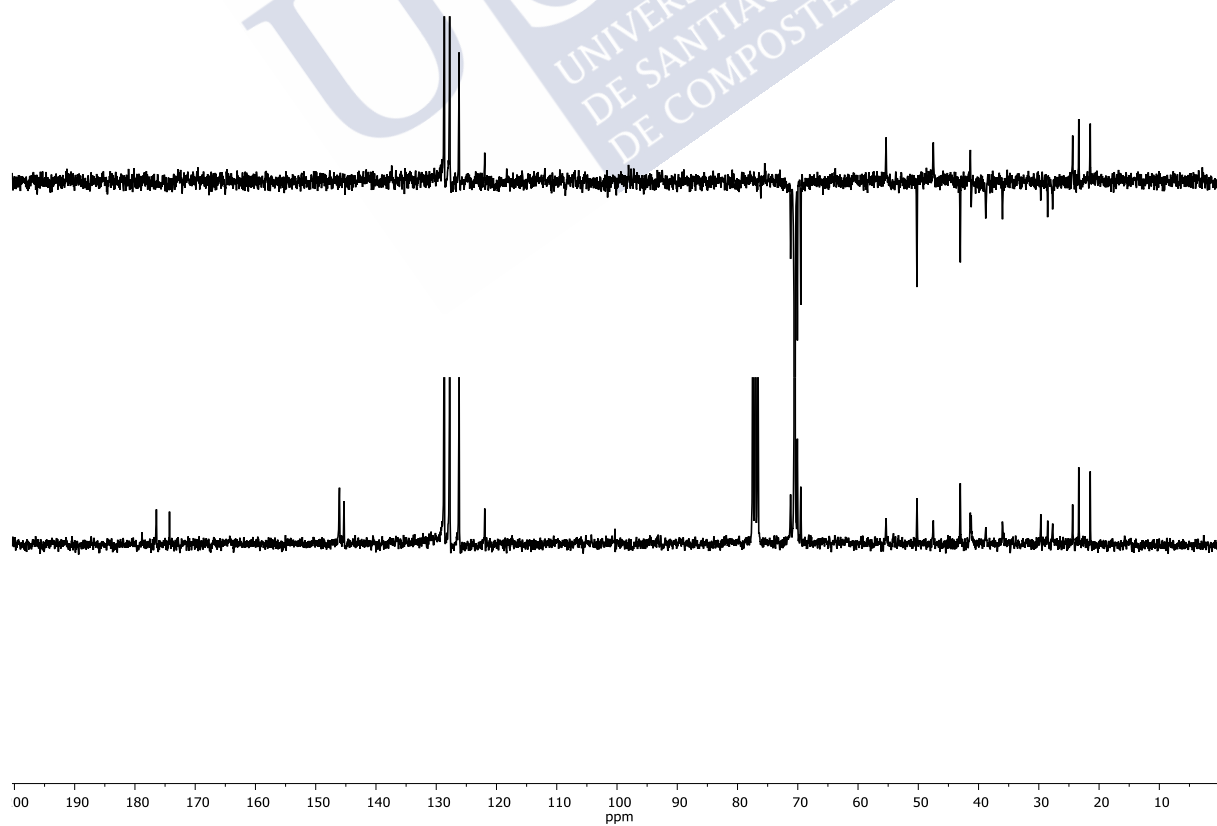


^{13}C y DEPT (10 mM en CDCl_3 , 298 K, 125 MHz)



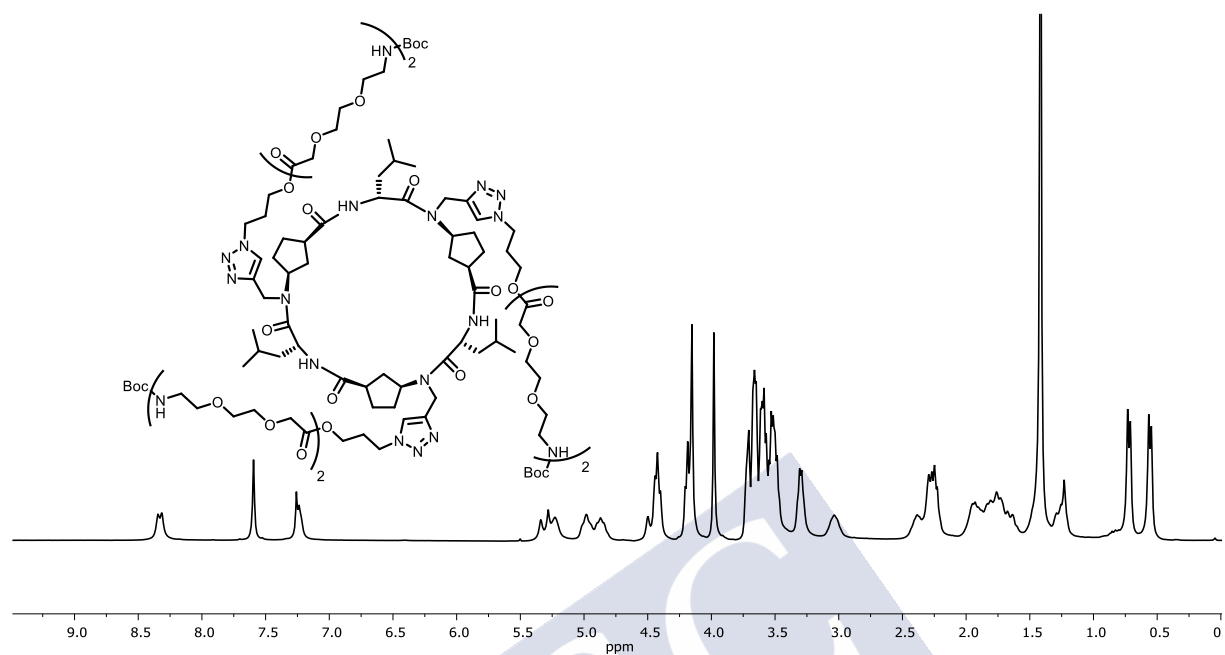
FT-IR (neat, 298 K)



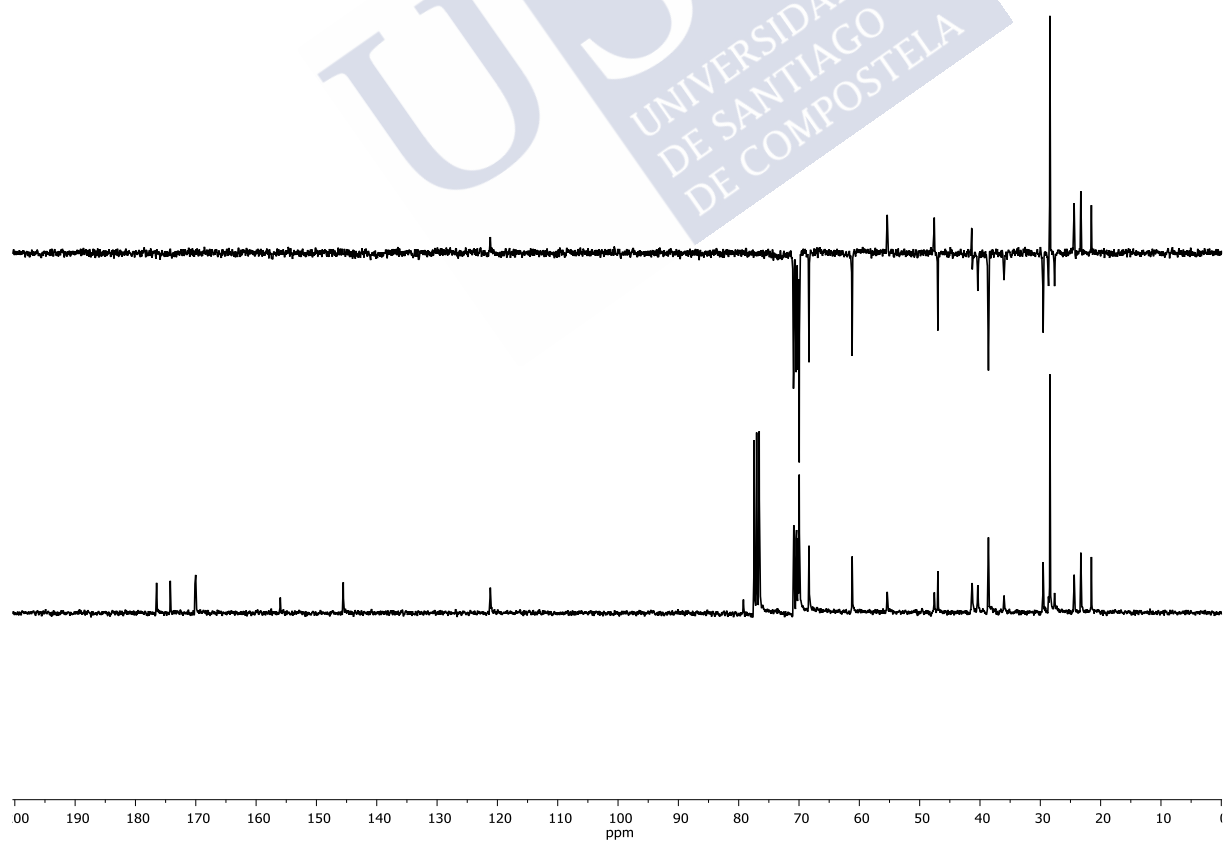
(Trt)-CP5L ^1H RMN (20 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz) ^{13}C y DEPT (20 mM en CDCl_3 , 298 K, 75 MHz)

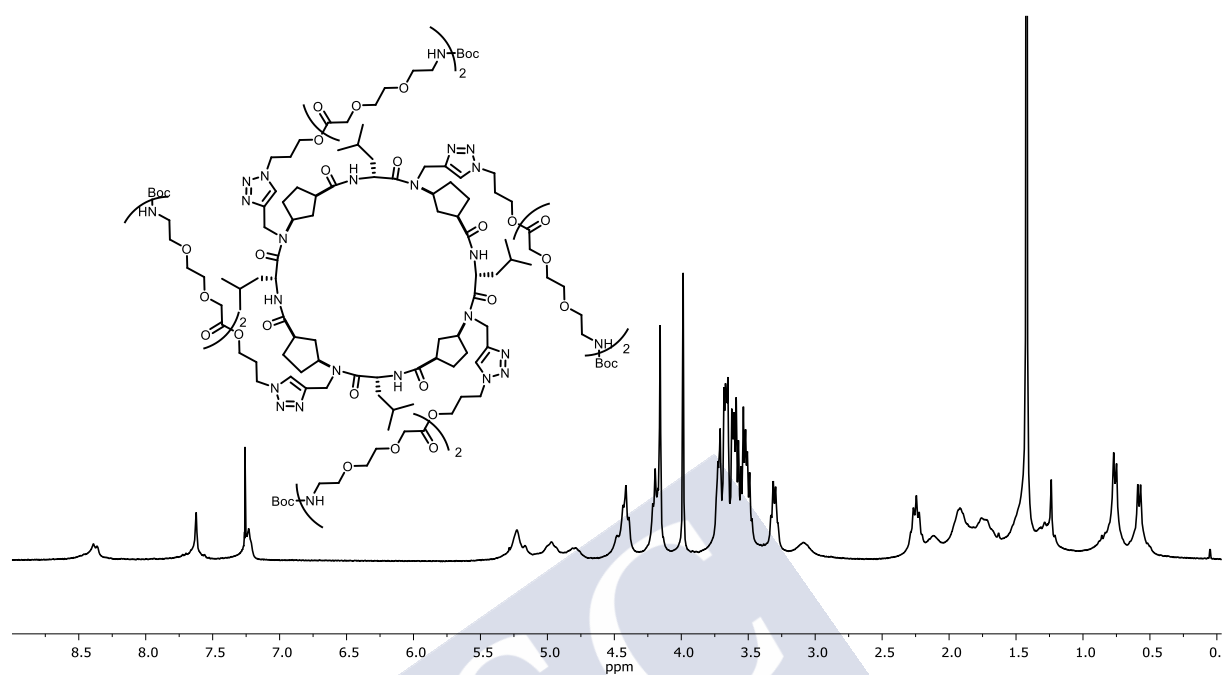
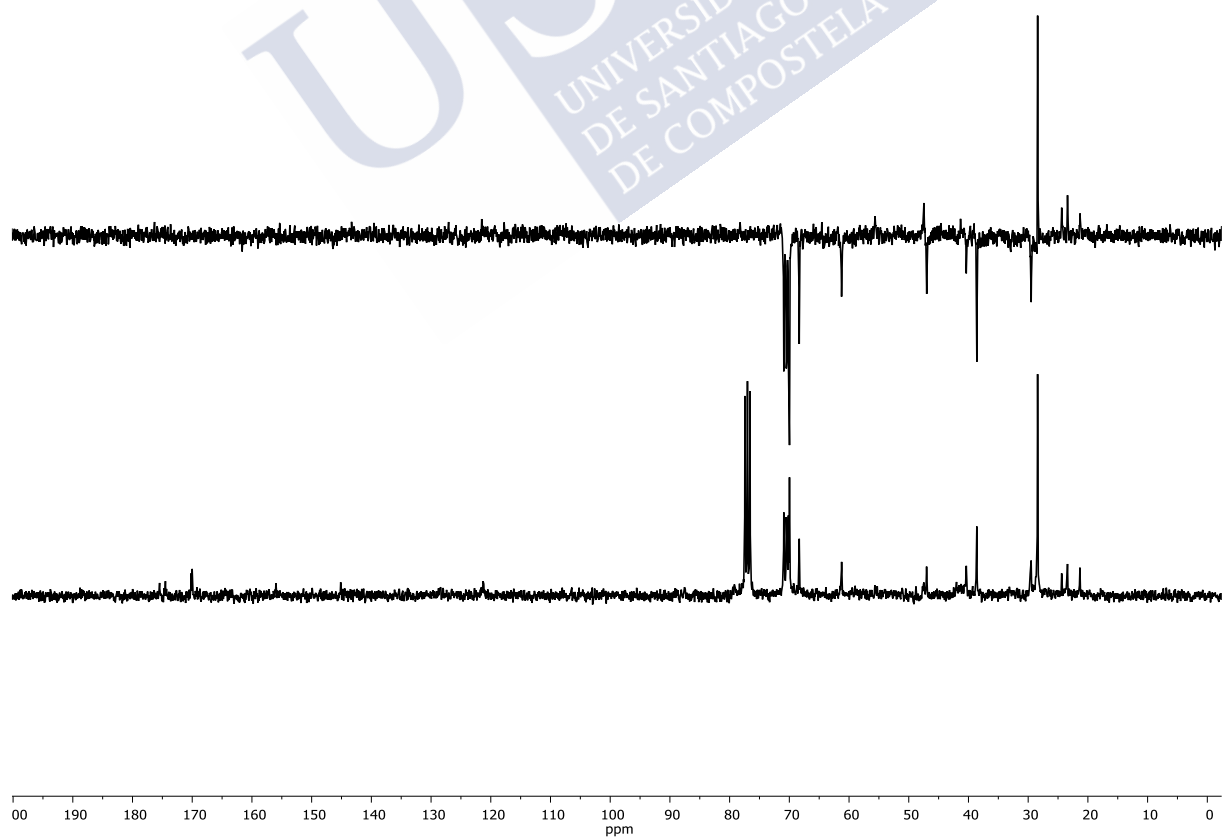
(Boc)-CP5S

^1H RMN (25 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz)



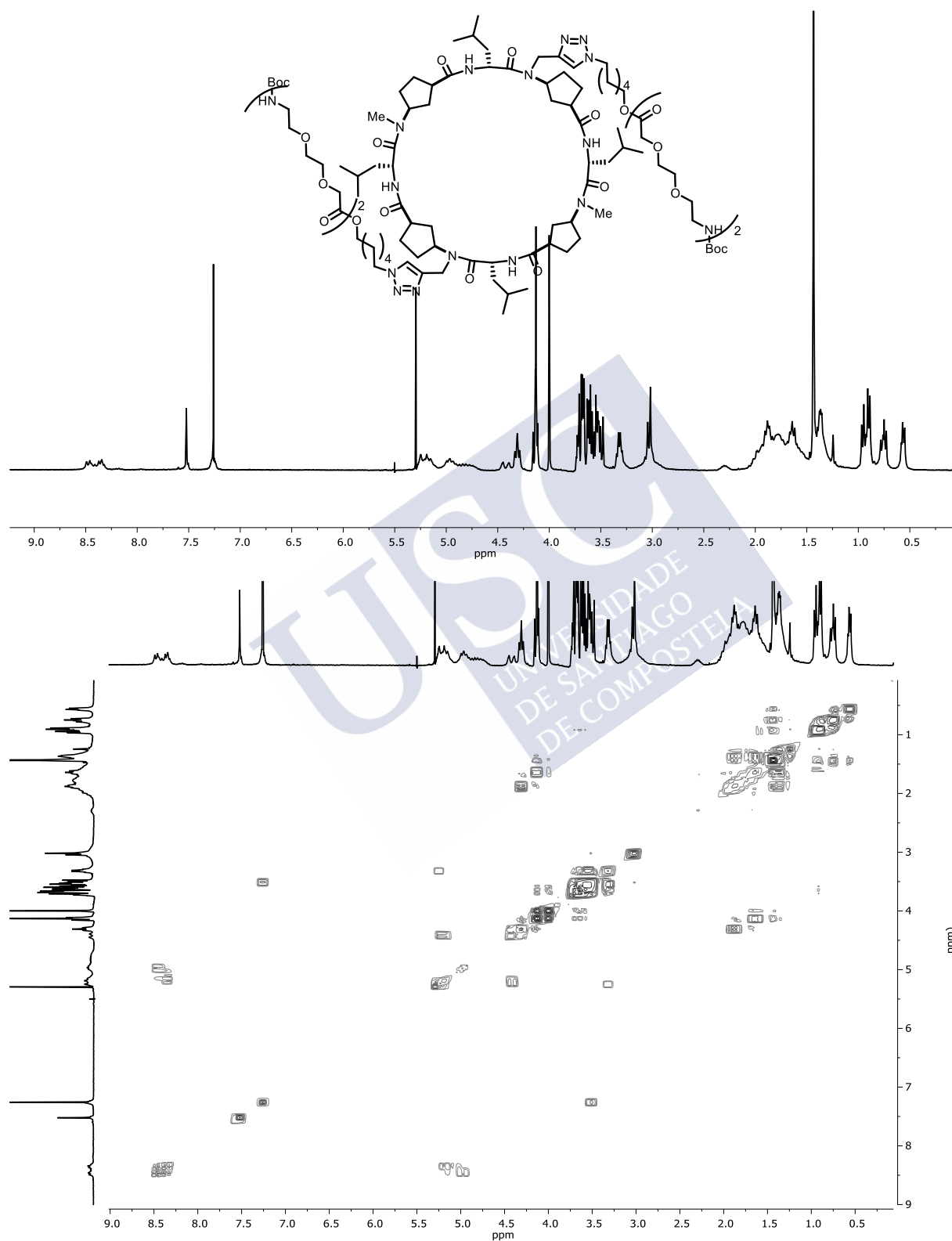
^{13}C y DEPT (25 mM en CDCl_3 , 298 K, 75 MHz)



(Boc)-CP11S ^1H RMN (15 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz) ^{13}C y DEPT (15 mM en CDCl_3 , 298 K, 75 MHz)

(Boc)-CP2I

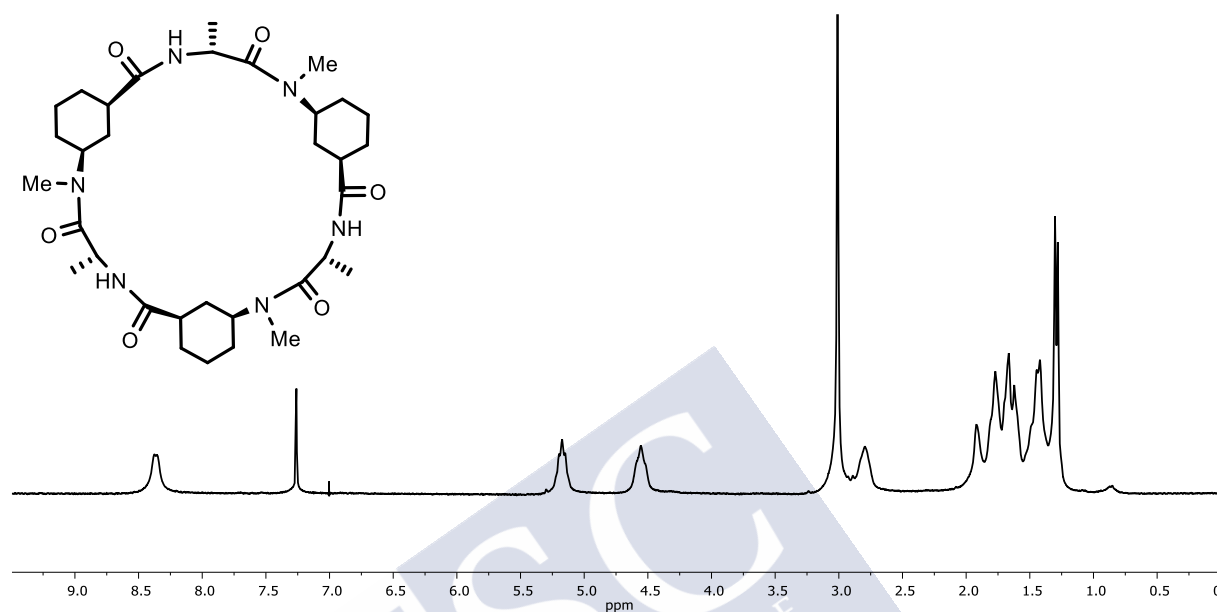
^1H RMN y COSY (10 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz)



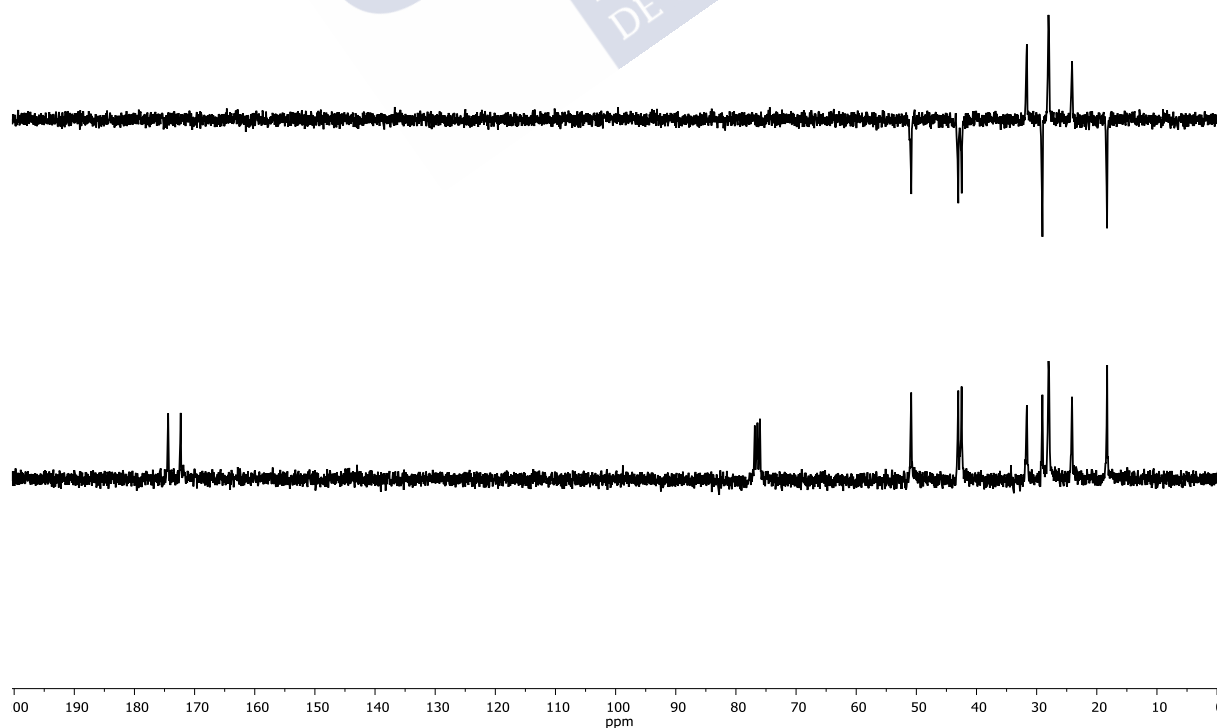
Capítulo III

c-[(D-Ala-^{Me}N-*L*-Ach)₃] (CP9)

¹H RMN (20 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)

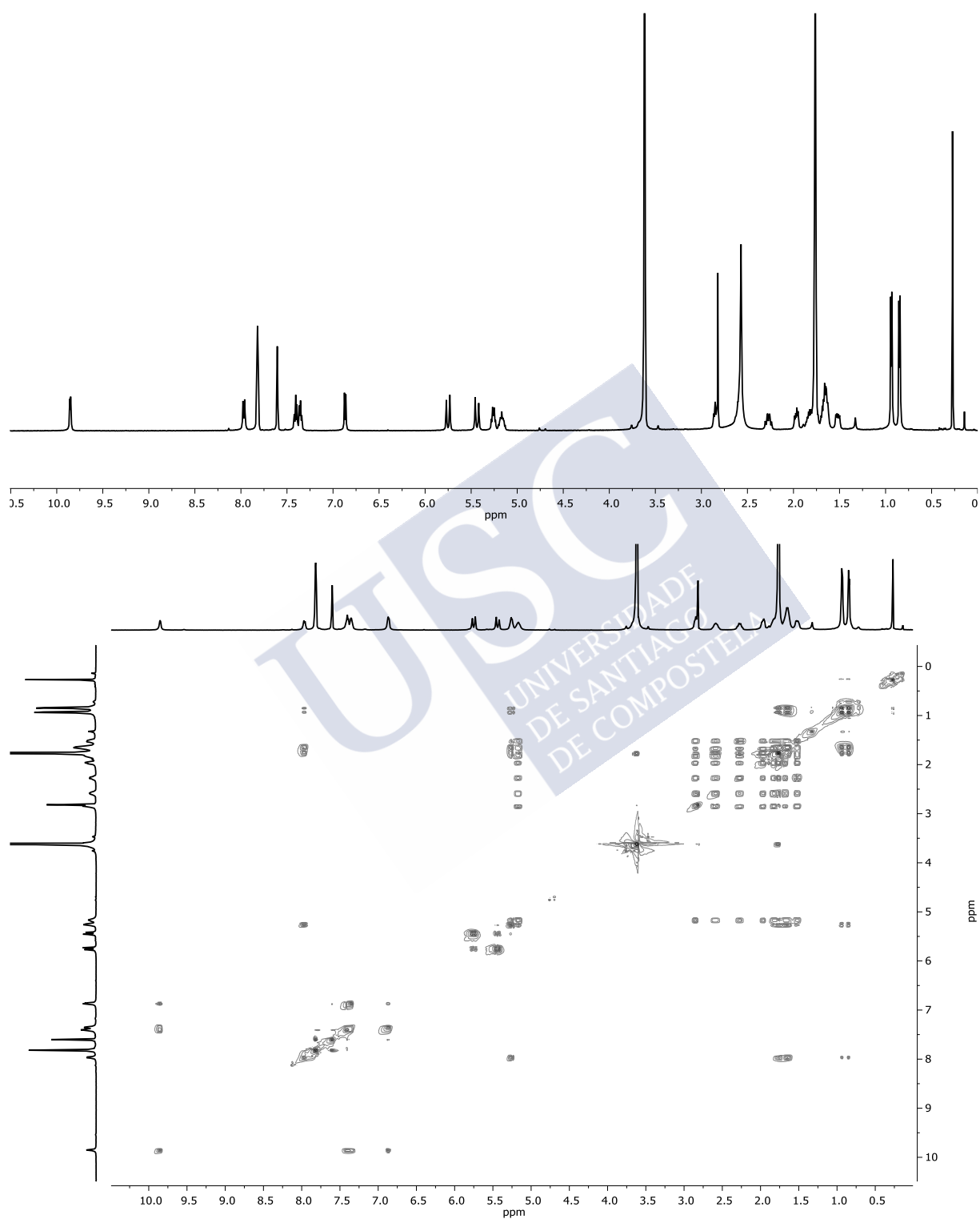


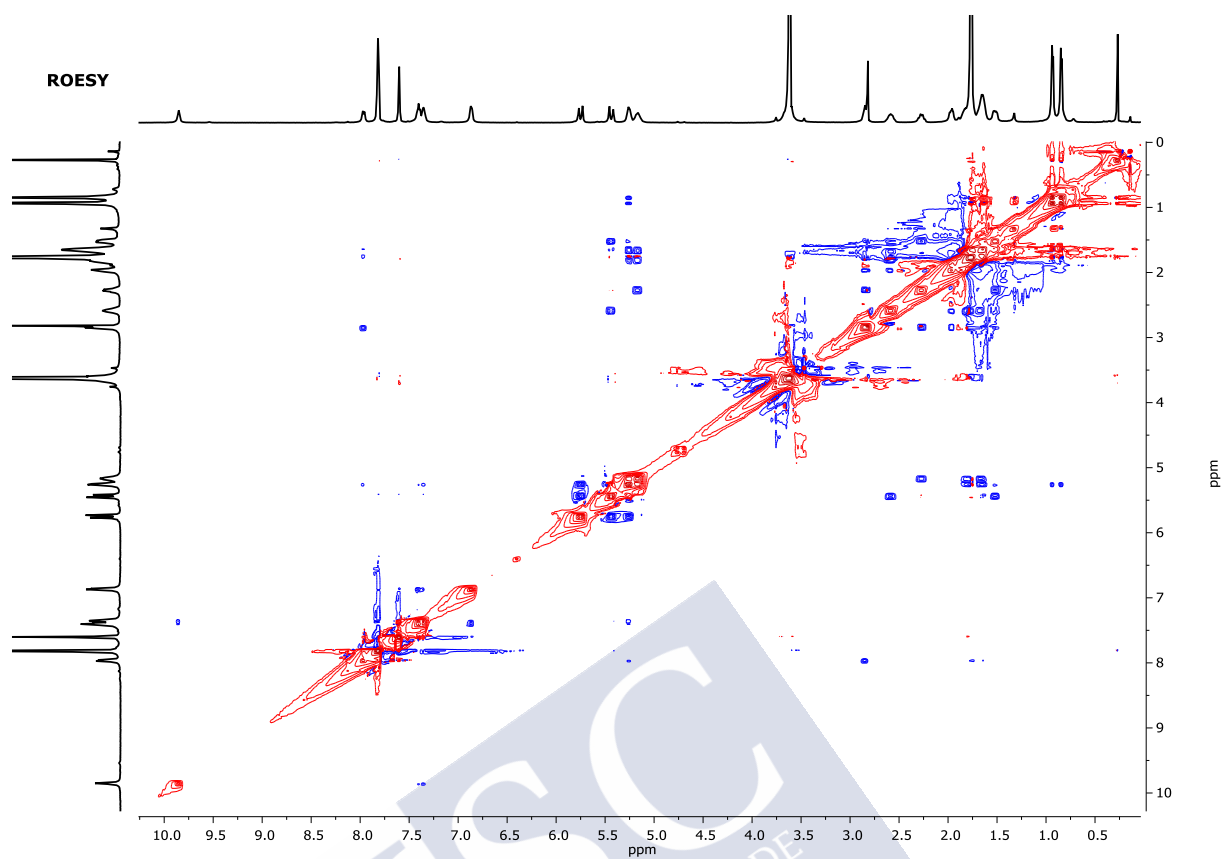
¹³C y DEPT (20 mM en CDCl₃, 298 K, 300 MHz)



(CuI₂)⊃D5a

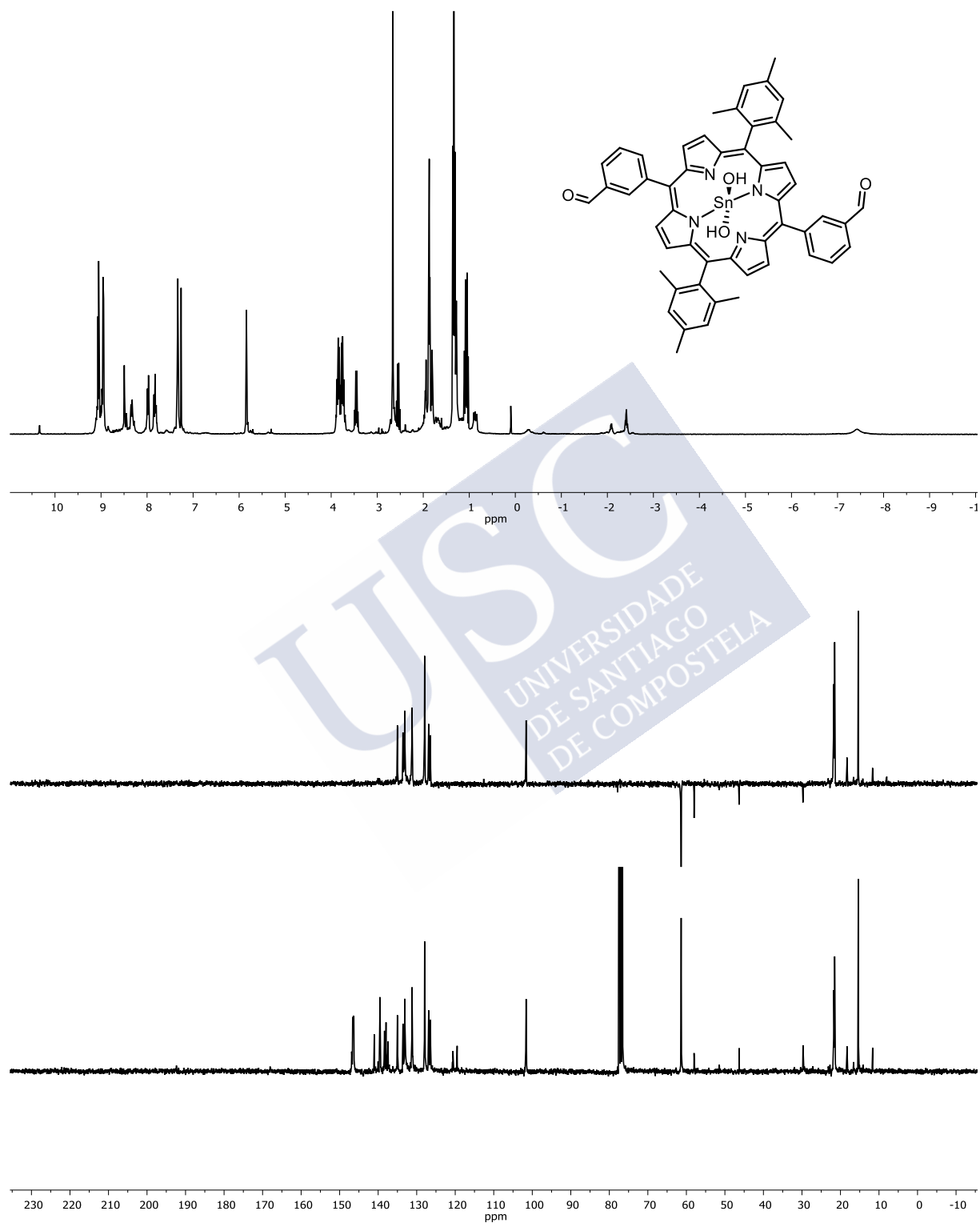
¹H, TOCSY y ROESY (5 mM en THF *d*₈, 298 K, 500 MHz)

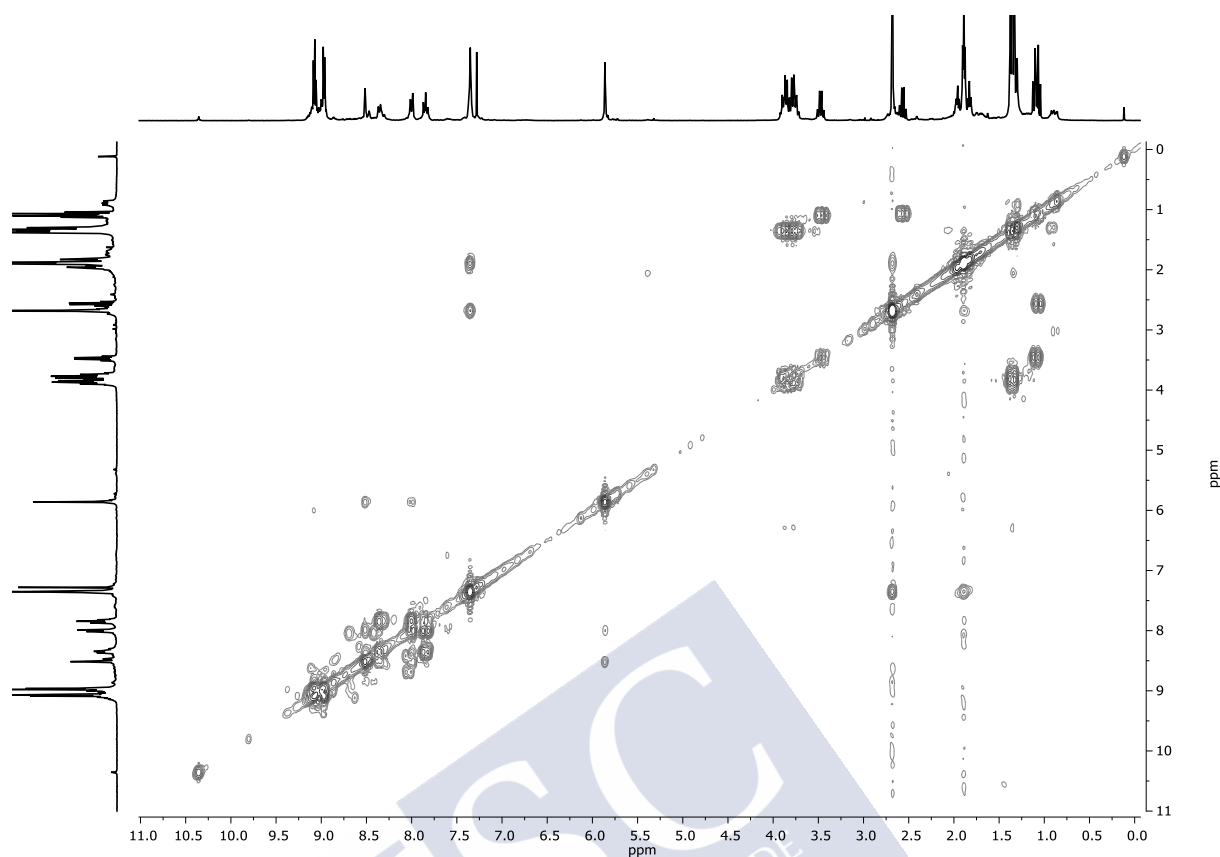




Por1A (en equilibrio con su derivado etil-acetalico)

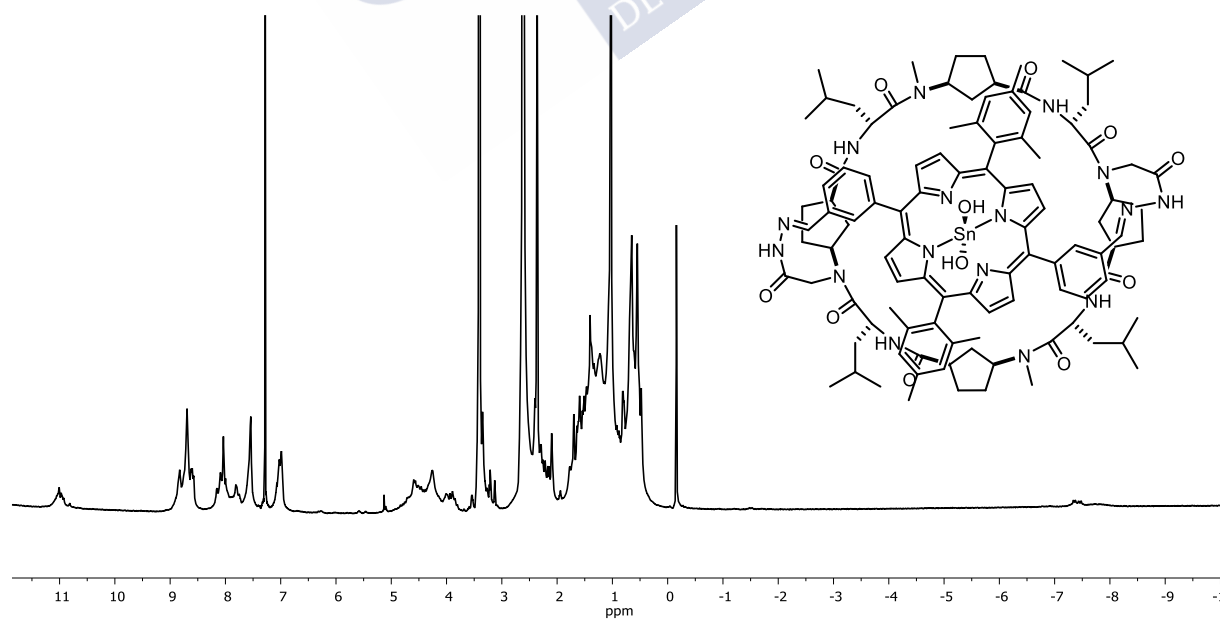
^1H , ^{13}C , DEPT y COSY (15 mM en CDCl_3 , 298 K, 300 MHz)

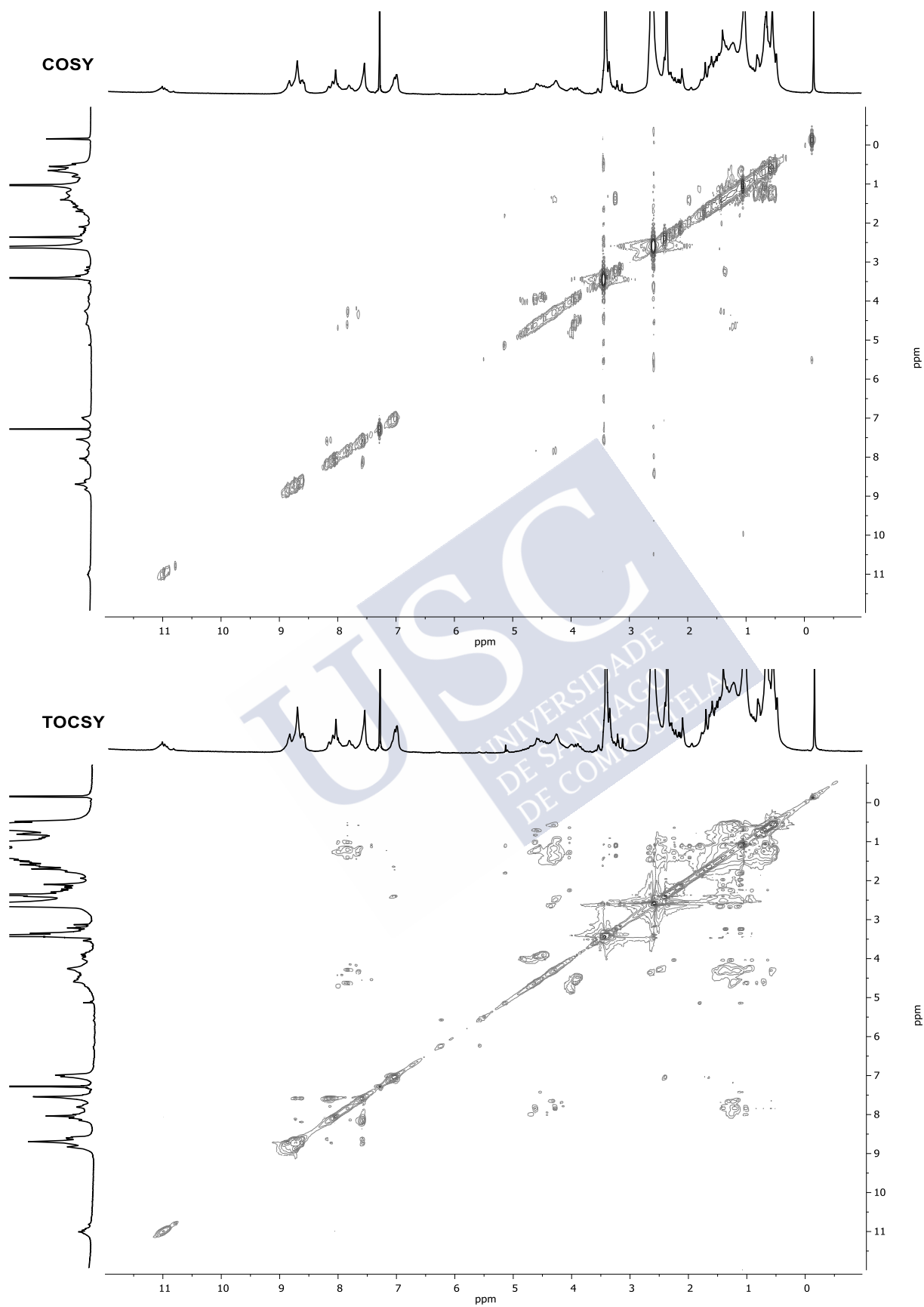


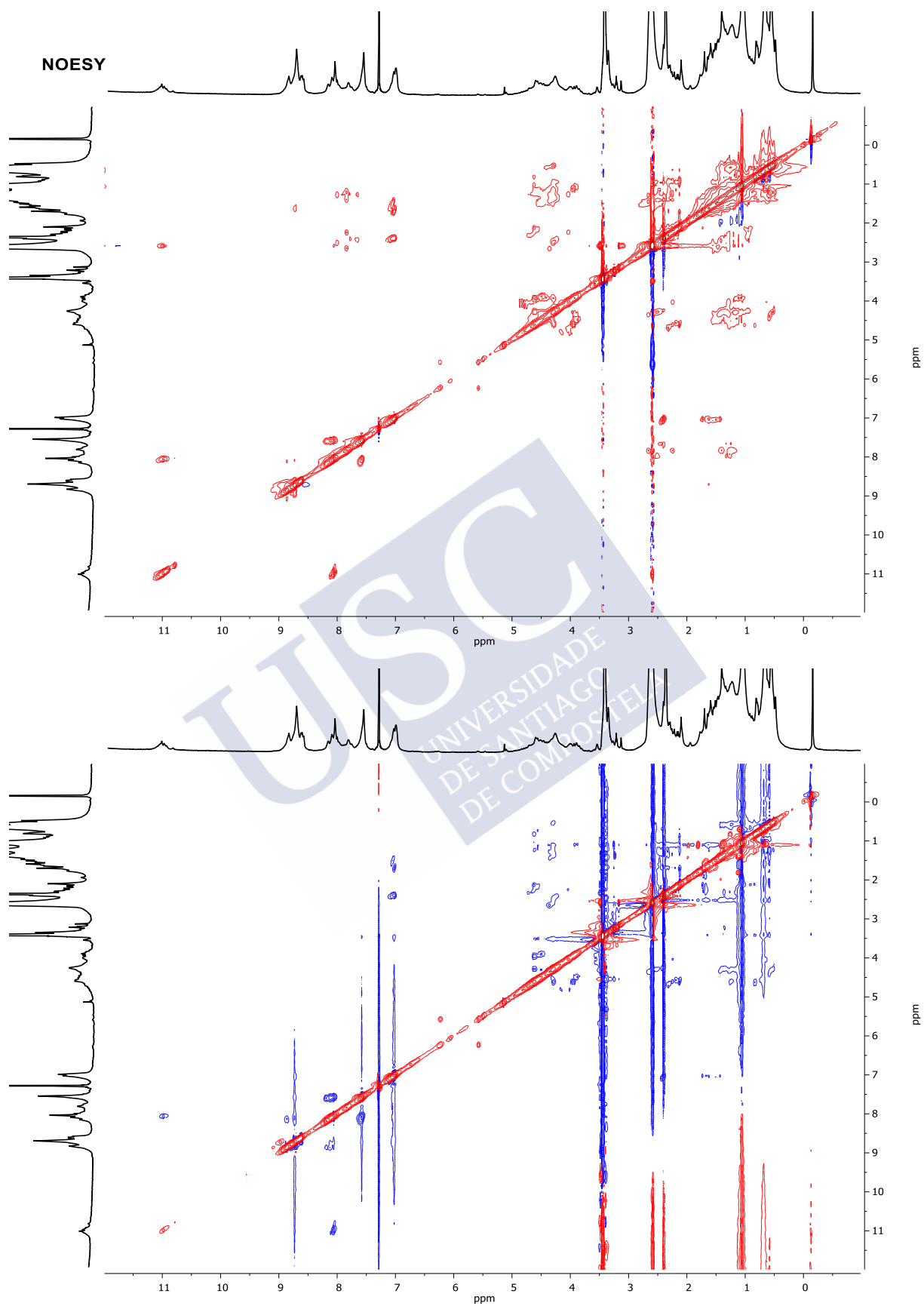


CP10A

^1H , COSY, TOCSY, NOESY y ROESY (10 mM en 10% DMSO d_6 /CDCl $_3$, 298 K, 500 MHz)







L3D10A-B

^1H , TOCSY y ROESY (5 mM en 10% DMSO d_6 /CDCl $_3$, 298 K, 500 MHz)

